

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Las patentes de sulfamidas y penicilinas en los primeros años del franquismo (1939-1963)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos José Pérez Teijón

Director

Antonio González Bueno

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia



Tesis doctoral

Carlos José Pérez Teijón

Las patentes de sulfamidas y penicilinas en los primeros
años del Franquismo (1939-1963)

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia

Las patentes de sulfamidas y penicilinas en los primeros
años del Franquismo (1939-1963)

Memoria presentada por Carlos José
Pérez Teijón, licenciado en Farmacia,
para optar al grado de Doctor.

Dirigida por Antonio González Bueno

Madrid, 2012

Antonio González Bueno, Catedrático de Historia de la Farmacia y Legislación farmacéutica, adscrito al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

INFORMA:

Que el trabajo de investigación titulado “Las patentes de sulfamidas y penicilinas en los primeros años del Franquismo (1939-1963)” realizado, bajo mi dirección, por D. Carlos José Pérez Teijón, constituye un trabajo original de investigación y reúne los requisitos exigidos como memoria de tesis doctoral, por lo que autorizo su presentación para que sea admitido a trámite y juzgado por el tribunal que se designe.

En Madrid, a 7 de septiembre de 2012

Antonio González Bueno

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al doctor Antonio González Bueno, director de este trabajo y a quien debo muchas de las ideas aquí expuestas; su dirección ha sido imprescindible para que esta memoria llegara a buen puerto.

Sin la colaboración del personal del Archivo Histórico de la Oficina Española de Patentes (AHOEPM), el acceso a las fuentes precisas para esta investigación no hubiera sido posible. También ha sido valiosa la ayuda prestada por el personal de la Biblioteca Nacional de España y de la Biblioteca de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

La paciencia de mi esposa, María Rosa, y de mis hijas Rosa Luz y María Pilar, son dignas de reconocimiento; también el tiempo que, por dedicarlo a este estudio, no lo han disfrutado mis nietos Emma y Leo.

La realización de este trabajo ha contado con el patrocinio del Plan Nacional I+D+I (2008-2011), auspiciado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, bajo el proyecto HAR 2009/09564, “La industria farmacéutica en la España autárquica”.

Índice

Introducción	011
1. LAS PATENTES DE SULFAMIDAS EN ESPAÑA (1936-1963)	
1.1. Introducción	015
1.2. Las patentes de sulfamidas	019
1.2.1. Amino-fenil-sulfamidas	022
1.2.2. Amino-benzol-sulfamidas	022
1.2.3. Derivados halogenados de sulfamidas	038
1.2.4. Derivados tiazólicos de sulfamidas	042
1.2.5. Toluol-sulfamidas	045
1.2.6. Colorantes azoicos	047
1.2.7. Sulfamidas derivadas de la pirimidina	049
1.2.8. Otras sulfamidas	053
1.3. Las empresas interesadas en el registro de sulfamidas	064
1.3.1. Las empresas españolas	065
1.3.2. Las empresas extranjeras	068
1.3.3. La tramitación de las solicitudes de patentes: tiempo y publicidad	072
2. LAS PATENTES DE PENICILINAS EN ESPAÑA (1936-1942)	
2.1. Introducción	075
2.2. Las patentes de penicilina	081
2.2.1. Los extractos penicilínicos	094
2.2.2. Producción de penicilina en condiciones sumergidas	099
2.2.3. Sales alcalinas de penicilina	106
2.2.4. Penicilinas procaínicas	154
2.2.5. Penicilinas biosintéticas	177
2.2.6. Penicilinas asociadas a otros antibióticos	244
2.2.7. Penicilinas sintéticas: derivados del ácido 6 amino- penicilánico (6-APA)	250
2.2.8. Anhidropenicilinas	338
2.2.9. Penicilinasas	340
2.3. Las empresas interesadas en el registro de penicilinas	345
2.3.1. Las empresas españolas	349
2.3.2. Las empresas extranjeras	357
2.3.3. La tramitación de las solicitudes de patentes: tiempo y publicidad	374
Conclusiones	395
Bibliografía	
I. Referencias relacionadas con el desarrollo de sulfamidas y penicilinas	399
II. Bibliografía secundaria	404

INTRODUCCIÓN

Las sulfamidas y penicilinas tienen una función que realizar en el mantenimiento de la salud de la población y entran, con todos los honores, en el arsenal terapéutico que cualquier sociedad bien organizada debe disponer para dar un servicio sanitario adecuado a sus componentes.

Entre las sulfamidas y las penicilinas ha existido una especie de sinergismo en sus usos médicos, pero la penicilina ha presentado mayor efecto antibiótico que las sulfamidas. Sulfamidas y penicilinas fueron -y son- dos grandes colosos de los antibióticos que han permitido salvar muchas vidas; ellas han sido el arma de la que la Humanidad ha dispuesto en la noble guerra contra nuestros enemigos naturales, las enfermedades.

Objetivos

El objetivo de esta investigación es analizar los métodos y procedimientos relacionados con sulfamidas y penicilinas registrados en España durante el período que media entre julio de 1936 a diciembre de 1963; señalar las empresas interesadas en su fabricación y, en la medida de lo posible, evaluar las técnicas empleadas y su utilidad para la salud humana y animal. Nuestro interés se centra en cuatro aspectos principales:

1º. Conocer los procesos de fabricación de sulfamidas y de penicilinas registrados en España durante el período 1936-1963.

2º. Analizar la presencia de la industria española en los expedientes de registros de estos productos.

3º. Analizar la presencia de la industria extranjera en las patentes españolas, relativas a sulfamidas y penicilinas, durante los primeros años del Franquismo.

4º. Valorar las mejoras técnicas de fabricación de los productos estudiados, en función del avance de los tiempos.

Material y método

Para este estudio hemos utilizado la información contenida en los expedientes del registro de patentes conservados en el Archivo Histórico de la Oficina Española de Patentes y Marcas (AHOEPM). Los límites temporales vienen impuestos por el propio desarrollo histórico del Franquismo: desde sus inicios, en julio de 1936, con la sublevación militar que dio inicio a la guerra civil, hasta la aprobación del Primer Plan de Desarrollo (1964-1967), mediante la Ley 194/1963 de 28 de diciembre (en vigor desde el 1 de enero de 1964)¹ y de la Ley de bases de la Seguridad Social², sancionadas ambas el día 28 de diciembre de 1963, y que constituyen un cambio especialmente significativo en el desarrollo de la industria farmacéutica española³.

¹ Ley 194/1963, de 28-XII, por la que se aprueba el Plan de Desarrollo Económico y Social para el período 1964/1967 y se dictan normas relativas a su ejecución (BB OO E 30-XII-1963; 31-XII-1963)

² Ley 193/1963, de 28-XII sobre Bases de la Seguridad Social (BOE 30-XII-1963).

³ Cf. Laura CHAQUÉS BONAFONT. *Políticas públicas y democracia en España: la política farmacéutica del franquismo a la democracia*. [Tesis doctoral, dirigida por Pere Vilanova Trias]. Barcelona: Universidad de Barcelona, 1997.

La visibilidad de las patentes analizadas ha sido valorada a través de la información difundida por *Ión*, la revista del Sindicato Nacional de Industrias Químicas; hemos escudriñado desde 1941, primer año de edición, hasta el final de 1965; la publicación se mantuvo activa hasta 1977.

El estudio de los expedientes de patentes de las empresas químico-farmacéuticas conservados en el Archivo Histórico de la Oficina Española de Patentes y Marcas (AHOEPM) conllevó el análisis individualizado de sus respectivas memorias descriptivas, de las cuales se obtuvieron los siguientes datos:

- Número del registro.
- Título de la patente.
- Solicitante de la patente (empresa y/o investigador) que la presentó.
- Domicilio social del solicitante.
- Fecha de solicitud.
- Fecha y lugar de presentación ante la Administración.
- Información de interés científico, en especial la que hacía referencia a las propiedades terapéuticas del producto obtenido, proceso de fabricación de éste, usos y formas de aplicación.
- Fuentes en las que se apoya la patente en cuestión y las técnicas de fabricación anteriores del producto, si la patente las menciona.

Realizado el estudio de las diferentes patentes, se analizaron las relaciones que pudieran tener unas con otras y se agruparon por su similitud; a veces con plena coincidencia, como es el caso de una patente y sus certificados de adición o patentes complementarias de un mismo producto desarrollado por la misma empresa.

Vistas las patentes que cumplían las condiciones dichas, éstas se estudiaron conjuntamente, formándose así los distintos grupos de patentes que se presentan en este trabajo de investigación. Esto nos permitió analizar cómo los productos de sulfamidas y penicilinas iban avanzando al transcurrir el trabajo de los investigadores, a la par que reveló los distintos caminos de investigación que desarrollaron los científicos, y que también fueron objeto de estudio de este trabajo.

Nuestro estudio presenta una limitación de búsqueda: sólo hemos analizado aquellos expedientes en cuyos títulos se mencionaba, de manera expresa, la palabra ‘sulfamida’, ‘penicilina’, ‘derivados penicilínicos’ o similares; quedan conscientemente fuera de nuestro análisis las alusiones a ‘sulfonamidas’, ‘sulfonas’, ‘sulfonilureas’, ‘sulfanilamidas’, ‘sulfapirimidinas’, ‘sulfoniluretanos’, ‘sulfotas’, ‘derivados con grupos sulfonamido’, ‘derivados con grupos benzol-sulfonil’, o similares; también las referencias generales a ‘antibióticos’, ‘sustancias antibióticas’ u otros antibióticos, como ‘actinomicina’, ‘anfomicina’, ‘aureomicina’, ‘catomicina’, ‘cefalosporina’, ‘cloranfenicol’, ‘epiramicina’, ‘eritromicina’, ‘estreptomicina’, ‘kanamicina’, ‘lincomicina’, ‘novobiocina’, ‘oleandomicina’, ‘tetraciclina’, ‘verrucarina’, ‘antibióticos anfóteros’ o ‘preparados bactericidas’, términos que figuran, durante el período objeto de estudio, en las páginas de la revista *Ión*. Por esta razón, algunos expedientes que han sido recientemente estudiados como ‘patentes de sulfamidas’⁴ o ‘patentes de penicilinas’⁵, no se encuentran en este trabajo.

⁴ Tal las ‘sulfonamidas’ alemanas estudiadas por Rafaela DOMÍNGUEZ VILAPLANA. *Las empresas químico-farmacéuticas alemanas en España (1879-1945): una visión desde el registro de patentes*. [Tesis doctoral, dirigida por Antonio González Bueno]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2009; Rafaela DOMÍNGUEZ VILAPLANA, Antonio GONZÁLEZ BUENO. “Las primeras patentes de sulfamidas

alemanas en España (1933-1945)” En: Esteban Moreno Toral, Antonio Ramos Carrillo (eds.). *Actas del 38 Congreso Internacional de Historia de la Farmacia*: [1-21]. Sevilla: Universidad de Sevilla, 2009.

⁵ Es el caso de los expedientes formados por *Lovens Kemiske Fabrik Produktions Aktieselskab* [Dinamarca]: “Un método de purificar soluciones de sustancias antibacterias formadas por el crecimiento de microorganismos” (AHOEPM, patente 186.738.); *Schenley Industries, Inc.* [EE.UU.]: “Un método para la aplicación de procedimientos microbiológicos” (AHOEPM, patente 193.056) y *Schenley Industries, Inc.* [EE. UU.]: “Un aparato para la aireación de líquidos” (AHOEPM, patente 194.256.). En cualquier caso, estos expedientes, estudiados por Ana ROMERO DE PABLOS (“Penicillin patents in Spain”. En: Ana Romero, Christoph Gradmann, María Jesús Santesmases (eds.). *Circulation of Antibiotics: Journeys of Drug Standards, 1930-1970*: 229-249. [Madrid]: European Science Foundation, 2009), en nada afectan a nuestras conclusiones; ocuparnos de ellos, una vez definidas las líneas generales de este trabajo, no ha sido posible.

1. LAS PATENTES DE SULFAMIDAS EN ESPAÑA (1936-1963)

1.1. Introducción

Las primeras investigaciones relacionadas con la síntesis de sulfamidas se remontan a los comienzos del siglo XX: el químico vienés Paul Gelmo (1879-1961), que desarrolló su trabajo en el *Laboratorium für Chemische Technologie Organischer Stoffe* preparó, en 1908, basándose en la reacción de Hinsberg, muy utilizada para la caracterización de aminas, una amida del ácido sulfanílico cuya utilidad primigenia fue la de colorante para bacterias. Sus trabajos se entroncan dentro de un amplio programa de investigación, desarrollado en la primera década de 1900, bajo la orientación de Heinrich Hörlein (1882-1954), director de investigaciones farmacéuticas de la *I.G. Farben*; dentro de él se prepararon un amplio conjunto de colorantes azoicos con grupos sulfamidos; éstos, empleados con éxito como mordientes en tintorería -debido a su gran resistencia al agua y a la luz, por su íntima penetración en las fibras de los tejidos-, no produjeron productos terapéuticamente útiles.

La actividad antimicrobiana de los colorantes azo fue probada, *in vitro*, por Philipp Eisenberg, corriendo el año de 1913, en la Universidad de Breslau, pero -ya desde estos primeros estudios- se señaló la imposibilidad de empleo *in vivo*, debido a su alta toxicidad. En 1917 Walter J. Jacobs y Michael Heidelberger, del *New York Rockefeller Institute*, obtuvieron compuestos azosulfamidos que demostraron *in vitro* gran acción bactericida.

Sobre estas bases, dos químicos de la empresa *Bayer*, entonces integrada en el coloso alemán *I.G. Farbenindustrie A.G.*, Josef Klarer (1898-1953) y Fritz Mietzsch (1896-1958) sintetizaron, en 1932, un nuevo producto con grupo sulfamido: 4'-sulfamido-2,4-diamino-azo-benzol: un polvo rojo, cristalino, de propiedades bactericidas⁶, registrado como *Protonsil*. El producto fue testado en ratones por el grupo de trabajo dirigido por el médico Gerhard Domagk (1895-1964); sus resultados, publicados en 1935, permitieron asegurar su utilidad frente a las infecciones estreptocócicas en animales; sus investigaciones se vieron recompensadas con el Premio Nobel en 1939⁷.

El trabajo con sulfamidas no fue exclusivo de los científicos alemanes; el grupo de investigadores conformado por Thérèse Tréfouël (1892-1978), Jacques Tréfouël (1897-1977), Federico Nitti (1903-1947) y Daniel Bovet (1907-1992), bajo la dirección de Ernest Fourneau (1872-1949), adscritos al *Institut Pasteur* de París, pusieron en evidencia, ya en 1935, que la estructura del *Prontosil* podía escindirse en dos partes: un grupo azo y un radical de sulfanilamida, responsable de la acción terapéutica del

⁶ El producto fue registrado por los químicos que se habían ocupado de su síntesis: Josef Klarer y Fritz Mietzsch, al servicio de la *I.G. Farbenindustrie A.G.*, el 24-XII-1932; acerca del descubrimiento del *Prontosil* cf. John E. LESCH. "Chemistry and biomedicine in an industrial setting: The invention of sulfa drugs". En: S.H. Mauskopf (ed.). *Chemical sciences in the modern world*: 158-215. Philadelphia [PA]: University of Pennsylvania Press, 1993; Mark WAINWRIGHT, Jette E. KRISTIANSEN. "On the 75th anniversary of Prontosil". *Dyes and Pigments*, 88(3): 231-234. Londres, 2011.

⁷ Acerca de la importancia terapéutica de las sulfamidas cf. David L. COWEN, Alvin B. SEGELMAN. *Antibiotics in historical perspective*. [S.l.]: Merck Sharp & Dohme International, 1981; en particular, el capítulo dedicado a "The Sulfonamides" (*Op. cit.*, págs. 125-133). Con más detalle, John E. LESCH. *The first miracle drug: how the sulfa drugs transformed medicine*. Oxford: Oxford University Press, 2007.

producto⁸; esta sulfanilamida se presenta como un cuerpo blanco, poco soluble en agua, conocida como ‘Prontosil blanco’. Los estudios del grupo dirigido por Thérèse Tréfouël demuestran la estrecha relación existente entre la constitución química y la acción farmacológica; para que la molécula fuera activa, era necesario que el grupo aminado se encontrara en posición ‘para’ con respecto al grupo sulfamido, careciendo de efecto terapéutico los compuestos en posición ‘orto’ o ‘meta’. Con sus trabajos, el equipo del *Institut Pasteur* abría una nueva vía quimioterapéutica, basada en la sustitución de átomos de hidrógeno en la molécula de sulfanilamida.

También en los laboratorios británicos se interesaron por esta familia de productos; Leonard Colebrook (1883-1967) y Méave Kenny confirmaron los estudios de Gerhard Domagk sobre animales, reprodujeron los trabajos del equipo de Ernest Fourneau sobre sulfanilamidas e iniciaron, en el *Queen Charlotte's Hospital* de Londres, la aplicación de sulfamidas a un grupo de pacientes con fiebres puerperales; sus resultados, hechos públicos en el verano de 1936, fueron satisfactorios⁹.

Tras estas investigaciones un buen número de empresas químicas y farmacéuticas se lanzaron a trabajar sobre el grupo ‘sulfa’; un auge que continuó durante los años de la Gran Guerra. Uno de los primeros problemas resueltos fue aumentar su solubilidad para permitir su administración por vía parenteral; aparece entonces el ‘Prontosil soluble’ el cual, junto al radical básico sulfanil-amídico, posee un radical naftalénico.

Un avance especialmente significativo se produce en 1937, debido a los trabajos emprendidos por un pequeño grupo de químicos adscritos de la empresa farmacéutica *May & Baker*, ubicada en Dageham, en las proximidades de Londres: George Newbery, Arthur James Ewins (1882-1957), director de investigaciones, y Montague Phillips, tratando de conseguir fórmulas solubles de sulfamidas obtienen, mediante el reemplazo de un átomo de hidrógeno de la sulfanilamida por un núcleo piridínico, la ‘sulfapiridina’, producto que ellos denominan 693 y que es el 2-para-amino-benceno-sulfamida-piridina. El producto demostró poseer una gran acción antineumocócica, propiedad que, en la primavera de 1938, fue comprobada en clínica; su empleo, inicialmente limitado a estas infecciones neumocócicas, particularmente la neumonía, se fue progresivamente extendiendo hacia el combate de otras afecciones: meningitis, gonorrea, infecciones estafilocócicas, etc¹⁰.

Pese al éxito inicial logrado mediante el empleo de las sulfapiridinas, las experiencias para lograr otros derivados de la sulfanilamida no se detuvieron; en 1938 Max Dohrn y Paul Dietrich, vinculados a *Schering A.G.*, reprodujeron el proceso de acetalización utilizado por el propio organismo para la desintoxicación de la

⁸ Thérèse TREFOUEL, Jacques TREFOUEL, Federico NITTI, Daniel BOVET. “Activité du p-aminophenyl-sulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin”. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*, 120: 756. París, 1935.

⁹ Leonard COLEBROOK, Méave KENNY “Treatment of human puerperal infections, and of experimental infections in mice, with Prontosil”. *The Lancet*, 227(5884): 1279-1281. Londres, 1936. Sobre los trabajos de Leonard Colebrook cf. J.L. TURK. “Leonard Colebrook: the chemotherapy and control of streptococcal infections”. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 87(12): 727-728. Londres, 1994; P.M. DUNN. “Dr Leonard Colebrook, FRS (1883-1967) and the chemotherapeutic conquest of puerperal infection”. *Archives of Disease on Childhood - Fetal Neonatal*, 93: 246-248. Londres, 2008.

¹⁰ John E. LESCH. “The discovery of M & B 693 (sulfapyridine)”. En: Gregory J. Higby, Elaine C. Stroud (eds.). *The Inside Story of Medicines: A Symposium*: 101-119. Madison [Wis.]: American Institute of the History of Pharmacy, 1997.

sulfanilamida; tras alguna tentativa fracasada, obtuvieron *Albucid*, una sulfacetamida (para-amino-fenil-sulfacetil-amida), originada al modificar la situación del radical acetil en la molécula¹¹.

Perrin H. Long (1899-1965) y Eleanor Bliss (1899-1987) del *Johns Hopkins Hospital* (Baltimore), trabajaron en los años centrales de la década de 1930 sobre sulfanilamidas y sulfapirimidinas¹². En este mismo hospital, el grupo dirigido por Eli Kennerly Marshall (1889-1966) logró sintetizar, en 1940, sulfanilguanidina, inicialmente considerada útil para atacar casos de disentería bacilar, cuya baja solubilidad y, con ello, su actividad prolongada, la convirtió en remedio imprescindible para las campañas militares desarrolladas en el Centro y Este europeo¹³. En estos primeros meses de la década de 1940, el equipo dirigido por Richard O. Roblin jr., vinculado al *Stamford Research Laboratories of the American Cyanamid Company*, sintetizó una sulfadiazina (2-sulfanil-amido-pirimidina o sulfapirimidina), de baja toxicidad y cuya utilidad terapéutica fue probada en clínica¹⁴.

En 1942 se habían sintetizado y estudiado más de 5.400 estructuras de sulfamidas y, para 1949, ya estaban disponibles en el mercado 57 preparaciones orales y 63 tópicas¹⁵.

La investigación sobre sulfamidas continuó en los años siguientes; los estudios realizados por el grupo de Marcel Janbon, en la Facultad de Medicina de Montpellier, en torno a 1942, sobre una sulfamida, la RP 2254 / VK 57, en el tratamiento de la fiebre tifoidea, le llevaron a observar crisis convulsivas en algunos de sus pacientes, en particular en aquellos que se encontraban más desnutridos; Auguste-Louis Loubatières (1912-1977) identificó estos trastornos con los que él obtenía al inducir severas hipoglucemias con altas concentraciones de insulina. La clínica permitió comprobar que ese tipo de sulfamida reducía los niveles de glucosa en diabéticos, al menos en pacientes ancianos; su mecanismo de actuación, sugerido por Loubatières en 1946, condujo al desarrollo de sulfonilureas para el tratamiento de algunos tipos de diabetes¹⁶.

¹¹ Max DOHRN, Paul DIEDRICH. "Albucid ein neues Sulfanilsäurederivat". *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 85: 2017-2018. Múnich, 1938.

¹² Perrin H. LONG, Eleanor BLISS. *Clinical and experimental use of sulfanilimide and sulfapyridine and allied compounds*. Nueva York: MacMillan, 1939. Datos biográficos de Eleanor Bliss en Tiffany K. WAYNE, Martha J. BAILEY. *American women of science since 1900*. Santa Barbara [Calif.]: ABC-CLIO, 2011 (cf. págs. 241-242); sobre Perrin Long cf. la necrológica de R. MORANDO. "Perrin H. Long, M.D., F.R.C.P. 1899-1965". *Med-Times*, 94(1): 138a. Irving [Calif.], 1966.

¹³ Eli Kennerly MARSHALL, A.C. BRATTON, H.J. WHITE, J.T. LITCHFIELD. "Sulphaguanadine: a chemotherapeutic agent for intestinal infections". *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 57: 163-188. Baltimore, 1940. Marcel H. BICKEL. "Eli K. Marshall, jr. (1889-1966): from biochemistry and physiology to pharmacology and pharmacokinetics". *Drug Metabolism Reviews*, 28(3): 311-344. Nueva York, 1996.

¹⁴ Richard O. ROBLIN jr., Philip S. WINNEK. "Chemotherapy I. Substituted Sulfanilamidopyridines". *Journal of the American Chemical Society*, 62(8): 1999-2002. Washington DC, 1940; Richard O. ROBLIN jr., James H. WILLIAMS, Philip S. WINNEK, Jackson P. ENGLISH. "Chemotherapy. II. Some Sulfanilamido Heterocycles". *Journal of the American Chemical Society*, 62(8): 2002-2005. Washington DC, 1940.

¹⁵ Cf. David L. COWEN, Alvin B. SEGELMAN. *Antibiotics in historical perspective*. [S.l.]: Merck Sharp & Dohme International, 1981 (cf. pág. 131).

¹⁶ J.-C. HENQUIN. "The fiftieth anniversary of hypoglycaemic sulphonamides. How did the mother compound work?". *Diabetologia*, 35(10): 907-912. Berlín, 1992; George DAILEY. "Insulin secretagogues: Who, what, when, and how?". *Current Diabetes Reports*, 5(5): 329-332. Philadelphia,

El éxito obtenido por las sulfamidas en el tratamiento de enfermedades microbianas llevaron a retomar las síntesis de otros compuestos químicos, ya conocidos, cuya actividad terapéutica no había sido abordada; es el caso de las sulfonas. Este tipo de compuestos habían sido sintetizados por Jakob Wittmann y Emil Fromm (1865-1928) en 1908, ellos obtuvieron dapsona (4-4'-diamino-difenil-sulfona [DDS]) y algunos de sus derivados, como *Promin*. En 1940, estos trabajos de síntesis fueron nuevamente abordados desde la empresa *Parke Davis*, por W.H. Feldman, quien comenzó a efectuar ensayos en animales en la clínica *Mayo*; sus esperanzadores resultados llevaron a Guy Faget (1891-1947) a la realización, en los primeros meses de 1941, de ensayos clínicos en el *National Leprosarium* de Carville (Louisiana); sus prometedoras conclusiones fueron publicadas en 1943¹⁷.

Pese al empleo habitual de sulfamidas y derivados, su mecanismo de actuación quedaba, en las primeras décadas de 1940, oculto bajo un velo de 'wonder drugs'; los británicos Donald D. Woods (Universidad de Oxford) y Paul Fildes (*Medical Research Council*) fueron los primeros en señalar su rol como antagonistas competitivos del ácido para-aminobenzoico; éste es componente del ácido fólico, necesario para el crecimiento bacteriano, las bacterias que sintetizan su propio fólico son las sensibles a las sulfamidas¹⁸.

La fórmula básica de las sulfamidas tiene similitud estructural con el ácido para-aminobenzoico. Las propiedades químicas, físicas, farmacológicas y antibacterianas de las diferentes sulfamidas se logran al ligar radicales (R) al grupo amida (-SO₂-NH-R) o al grupo amina (-NH₂) del núcleo sulfamida; realmente es el azufre el que se une directamente al anillo benceno, el grupo -NH₂ es una estructura esencial y suele sustituirse por radicales que se transformen, en el organismo, en un grupo amino libre¹⁹.

El uso generalizado de este tipo de productos, en muchas ocasiones como medida profiláctica durante la Segunda Gran Guerra, generó la aparición de cepas resistentes de estafilococos, estreptococos y meningococos; entre los efectos secundarios asociados a la terapia con sulfamidas figuraron las anemias hemolíticas agudas, daños renales y hepáticos. Tras su rápida expansión, las sulfamidas comenzaron a dejar paso, avanzada la década de 1940, a un nuevo tipo de antibióticos: las penicilinas.

En España, los primeros expedientes de sulfamidas fueron presentados en 1933, se responsabilizó de ellos el consorcio *I.G. Farbenindustrie*; son copia de las patentes

2005; Marie-Madeleine LOUBATIÈRES-MARIANI. "The discovery of hypoglycemic sulfonamides". *Journal de la Societe de Biologie*, 201(2): 121-125. París, 2007.

¹⁷ Gottfried WOZEL. "The story of sulfones in tropical medicine and dermatology". *Internacional Journal of Dermatology*, 28(1): 17-21. Burell [Florida], 1989; John PARASCANDOLA. "Sulfones and the miracle at Carville". *Revue d'Histoire de la Pharmacie*, 44(312 suppl): 409-412. París, 1996.

¹⁸ Donald D. WOODS. "The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide". *British Journal of Experimental Pathology*, 21: 74-90. Londres, 1940; Paul FILDES. "The mechanism of the anti-bacterial action of mercury". *The British Journal of Experimental Pathology*, 21(2): 67-73. Londres, 1940; Paul FILDES. "A rational approach to research in chemotherapy". *The Lancet*, 235(6091): 955-957. Londres, 1940; Donald D. WOODS. "The biochemical mode of action of the sulphonamide drugs". *Journal of General Microbiology*, 29: 687-702. Londres, 1962.

¹⁹ Manuel LITTER. *Farmacología experimental y clínica*. [séptima edición]. Buenos Aires: El Ateneo, 1986 (cf. págs. 1562-1590).

que el mismo consorcio había presentado, el año anterior, ante la Administración alemana²⁰.

1.2. Las patentes de sulfamidas

Nuestro análisis se circunscribe a un período de la Administración franquista, el comprendido desde enero de 1939 hasta diciembre de 1963; durante él se presentaron 36 expedientes de ‘sulfamidas’ *sensu stricto* que, para este estudio, hemos organizado en ocho bloques. Para conformar cada uno de estos grupos hemos organizado las patentes que tratan de la misma línea de trabajo, sobre todo si corresponden a la misma empresa y la solicitud se ha presentado en fechas próximas, pues en ese caso las patentes suelen tratar del mismo compuesto o similares, siendo la segunda y siguientes una ampliación de la primera. Los grupos se diferenciarán entre sí por alguna cualidad química de las sulfamidas que los forman.

1. Amino-fenil-sulfamidas
2. Amino-benzol-sulfamidas
3. Derivados halogenados de sulfamidas
4. Derivados tiazólicos de sulfamidas
5. Toluol-sulfamidas
6. Colorantes azoicos
7. Sulfamidas derivadas de la pirimidina
8. Otras sulfamidas
 - 8.a. Isoxazoles
 - 8.b. Disulfamidas
 - 8.c. Sulfamido-metoxi-piridazinas
 - 8.d. Sulfamidas asociadas a compuestos argénticos
 - 8.e. Sulfamidas indólicas
 - 8.f. Sulfamidas asociadas a tetraciclinas

Solicitud	Patente	Grupo	Solicitante / Patente
1938. 29-IV	144.173	1.1	Antonio Esteve Subirana [Manresa, Barcelona] Procedimiento para la preparación de la para-amino-fenil-sulfamida.
1939. 2-III	146.561	1.2	Schering A.G. [Alemania] Procedimiento para la obtención de derivados de las sulfamidas.
1940. 16-I	147.802	1.2	I.G. Farben [Alemania] Obtención de compuestos sulfamídicos.
1940. 19-II	149.121	1.2	José Andreu Miralles y Juan Andreu Miralles [Barcelona] Perfeccionamiento de la obtención de la p-amino-benceno-sulfamida.

²⁰ Se trata de la patente de invención, solicitada en diciembre de 1933, con el título “Procedimiento para la obtención de combinaciones azo” (AHOEPM, patente 132.970) y dos certificados de adición, presentados en 17-XII-1934 y 20-III-1935, respectivamente (AHOEPM, patente 135.898; patente 137.629); de su análisis se han ocupado Rafaela DOMÍNGUEZ VILAPLANA, Antonio GONZÁLEZ BUENO. “Las primeras patentes de sulfamidas alemanas en España (1933-1945)” En: Esteban Moreno Toral, Antonio Ramos Carrillo (eds.). *Actas del 38 Congreso Internacional de Historia de la Farmacia*: [1-21]. Sevilla: Universidad de Sevilla, 2009.

1941. 8-I	151.403	1.2	<i>Gesellschaft Chemische Industrie in Basel</i> [Suiza] Procedimiento para la obtención de nuevas sales derivadas de benzosulfamidas.
1941. 30-I	151.608	1.2	<i>Schering A.G.</i> [Alemania] Certificado de adición a la patente 146.561 [Procedimiento para la obtención de derivados de las sulfamidas].
1941. 28-II	151.993	1.2	<i>Gesellschaft Chemische Industrie in Basel</i> [Suiza] Procedimiento para la obtención de nuevos derivados de benzosulfamida.
1941. 20-XII	155.394	1.2	<i>Clemente Sierra</i> [Bilbao] Procedimiento de obtención de amino-benzol-sulfamidas.
1942. 22-I	155.966	1.2	<i>Instituto Farmacológico Latino S.L.</i> [Madrid] Procedimiento para obtener la reacción entre sulfo-halogenuros amino-bencénicos y aminas primarias sustituidas, aplicable a la preparación de las sustancias medicinales llamadas vulgarmente sulfamidas.
1942. 17-IV	156.752	1.3	<i>Jacinto Megias Fernández</i> [Madrid] Procedimiento de obtención de derivados di-bromados en el núcleo de la sulfamida.
1942. 18-IV	156.775	1.2	<i>Deutsche Hydrierwerke A.G.</i> [Alemania] Procedimiento para obtener derivados de sulfamidas cíclicas.
1942. 30-IV	156.950	1.2	<i>Deutsche Hydrierwerke A.G.</i> [Alemania] Procedimiento para obtener derivados de sulfamidas cíclicos.
1942. 25-IX	158.715	1.2	<i>Gesellschaft Chemische Industrie in Basel</i> [Suiza] Procedimiento para la obtención de derivados de p-amino-benzol-sulfamidas.
1943. 12-III	161.055	1.3	<i>Ramón de Montaner Giraudier</i> [Barcelona] Procedimiento para la obtención de nuevos productos derivados de las sulfamidas.
1943. 29-VII	162.528	1.2	<i>Schering A.G.</i> [Alemania] Segundo certificado de adición a la patente 146.561 [Procedimiento para la obtención de derivados de las sulfamidas].
1944. 22-I	164.635	1.3	<i>Ramón de Montaner Giraudier</i> [Barcelona] Mejoras en el procedimiento de obtención de nuevos productos derivados de las sulfamidas, objeto de la patente principal número 161.055. [Procedimiento para la obtención de nuevos productos derivados de las sulfamidas].
1946. 5-I	172.048	1.4	<i>Hoffmann-La Roche Inc.</i> [EE. UU.] Un procedimiento para preparar derivados de la sulfamida solubles en agua.
1947. 2-X	179.972	1.5	<i>Coloma Giralt Domènech</i> [Badalona, Barcelona] Un nuevo procedimiento para la fabricación de orto-toluidina sulfamida, necesaria en la obtención del ácido orto-sulfamido-benzoico.
1948. 29-I	182.320	1.5	<i>Rogelio Boix Güell</i> [Manresa, Barcelona] Un nuevo procedimiento para la obtención de sulfamida benzoica.

1950. 25-IV	192.849	1.3	<i>Ramón de Montaner Giraudier</i> [Barcelona] Procedimiento para la obtención de derivados ftálicos de la mono-yodo-sulfamida.
1951. 7-VII	198.785	s/c	<i>Juan Martí Camp y José Alberti Gubern</i> [España] Procedimiento de obtención de una sulfamida insoluble.
1955. 3-VI	222.209	1.4	<i>Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A.</i> [Barcelona] Un procedimiento para la obtención de sulfamidas.
1956. 16-VI	229.154	1.2	<i>Laboratorio Martín Cuatrecasas S.A.</i> [Barcelona] Nuevo método de preparación de sulfamidas.
1957. 1-III	233.958	1.8	<i>F. Hofmann-La Roche & Cie. S.A.</i> [Suiza] Procedimiento para la preparación de una sulfamida de la serie de los isoxazoles.
1958. 13-XI	245.281	1.2	<i>Ciba, S.A.</i> [Suiza] Procedimiento para la obtención de nuevas sulfamidas.
1958. 6-XI	245.390	1.8	<i>Merck & Co.</i> [EE. UU.] Procedimiento para preparar compuestos de sulfamidas.
1959. 24-I	246.746	1.8	<i>Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A.</i> [Barcelona] Un perfeccionamiento en el procedimiento de preparación de una sulfamida.
1960. 25-X	262.752	1.8	<i>Jesús Camón Cano</i> [Zaragoza] Procedimiento para suprimir la toxicidad de las penicilinas por vía digestiva por medio de los efectos sinérgicos de su asociación con un tipo especial de coloide de plata.
1960. 21-XII	263.469	1.6	<i>Société Carbochimique S.A.</i> [Bélgica] Procedimiento para la preparación de nuevos colorantes sulfamidados.
1960. 21-XII	263.470	1.6	<i>Société Carbochimique S.A.</i> [Bélgica] Procedimiento para la preparación de nuevos colorantes sulfamidados.
1961. 11-II	264.827	1.7	<i>Hofmann-La Roche & Cie. S.A.</i> [Suiza] Procedimiento para la fabricación de sulfamidas del grupo pirimidínico.
1961. 16-V	267.411	1.2	<i>Sandoz A.G.</i> [Suiza] Procedimiento de obtención de nuevas sulfamidas.
1961. 28-VI	268.685	1.8	<i>Chemische Fabrik von Heyden A.G.</i> [Alemania] Un procedimiento para la fabricación de halogenuros del ácido sulfónico y sulfamidas del indol y de sus derivados.
1961. 21-XII	273.136	1.2	<i>Sandoz, A.G.</i> [Suiza] Un procedimiento para la obtención de nuevas sulfamidas.
1962. 21-XI	282.689	1.8	<i>Antonio Gallardo S.A.</i> [Barcelona] Procedimiento para la preparación de sulfamidas con tetraciclina o sus derivados.
1963. 8-X	292.294	1.7	<i>Schering A.G.</i> [Alemania] Procedimiento para la fabricación de nuevas sulfamidas de acción prolongada reductoras de la glucemia.

1.2.1. Amino-fenil-sulfamidas

El 29 de abril de 1938, el farmacéutico Antonio Esteve Subirana²¹, residente en Manresa (Barcelona), sin duda en representación de los *Laboratorios Dr. Esteve S.A.*, presentó una patente de introducción para proteger un “Procedimiento de preparación de la para-amino-fenil-sulfamida”²²; el autor parte de anilina que, pasando por acetanilida o sulfanilato sódico como producto intermedio, lleva a la síntesis del producto deseado²³. El producto obtenido era un polvo blanco, cristalino, insoluble en agua fría y, aunque soluble en agua caliente, su administración presentaba serias dificultades. Este procedimiento de obtención, aunque desarrollado en el extranjero, no se había puesto en marcha en España, por lo que el solicitante lo presenta como objeto una patente de introducción.

1.2.2. Amino-benzol-sulfamidas

Las amino-benzol-sulfamidas constituyen el grupo mayor y más significativo de las ‘sulfamidas’ *sensu stricto* registradas en nuestro país durante el período objeto de estudio; lo componen dieciseis expedientes, la mayor parte de ellos presentados por empresas de origen alemán o suizo, a las que se unen algunos procedimientos propuestos por empresas españolas.

Con fecha de 2 de marzo de 1939 la empresa alemana *Schering A.G.* presentó, ante el registro español, una patente de invención destinada a proteger un

²¹ Antonio Esteve Subirana (Manresa, 1902 / Barcelona, 1979), se había licenciado en Farmacia, por la Universidad de Barcelona, en 1924; en 1932 obtuvo la borla doctoral en Farmacia por la Universidad Central. Asentado profesionalmente en Manresa, fundó la empresa *Laboratorios Dr. Esteve S.A.*, bajo esta cobertura registró algunos preparados vitamínicos y el primer producto arsenical antilúético; durante la II República estuvo afiliado a ‘Acció Catalana’. Tras la guerra civil, y después de un breve exilio en Francia, trasladó a Barcelona *Laboratorios Dr. Esteve S.A.* y creó una pequeña planta industrial. Antonio Esteve formó parte de la Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i de Balears, de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Barcelona y del Institut d'Estudis Catalans, siempre mantuvo una marcada actividad política de carácter republicano (Cf. Joan LAPORTE. “Antoni Esteve”. *Butlletí de la Secció de Matemàtiques de la Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques*, 5: 15-17. Barcelona, 1980; Ramón JORDI I GONZÁLEZ. *Colecció de ‘speciers’, mancebos boticarios, boticarios, farmacéuticos practicantes de farmacia y farmacéuticos en Catalunya (1207-1997)*. Barcelona: Fundació Uriach, 2003; cf. pág. 358).

²² AHOEPM, patente 144.173. El expediente, de tres hojas, queda firmado en Barcelona, a 29 de abril de 1938; como domicilio hace constar el número 25 de la calle Urgel (Manresa, Barcelona). La solicitud, para una patente de introducción, fue concedida el 31 de diciembre de 1939 y publicada un día después, el 1 de enero de 1940.

²³ El autor expone el procedimiento con una realización práctica: en 1.800 g. de ácido cloro-sulfónico se disuelven 416 g. de acetanilida; la solución se calienta a 60° C, a continuación se vierte sobre hielo; el sulfocloruro formado se recoge en un filtro de Büchner. Toma 560 g. del sulfocloruro, añade amoníaco al 50% hasta conseguir su disolución; ya disueltos, se hierven en un baño de vapor: al enfriar, la acetosulfamida precipita. En ácido clorhídrico 5 N se disuelven 400 g. de acetosulfamida; la solución se hierva en baño de vapor, debe neutralizarse, consiguiendo con ello la precipitación de la para-amino-fenil-sulfamida con un grado de pureza aceptable. El sulfocloruro se podría obtener usando sulfanilato sódico; en este caso el ácido sulfanílico se neutraliza obteniéndose sulfanilato sódico, que se debe acetilar; al tratarlo con pentacloruro de fósforo se obtiene el sulfocloruro deseado. Con independencia de la toxicidad de los productos empleados, el autor no concreta bien las condiciones físicas y/o químicas del método empleado, entre ellas la temperatura de la disolución de los reactivos o el tamponamiento de la solución para trabajar a un pH determinado.

“Procedimiento para la obtención de derivados de las sulfamidas”²⁴. Todos los compuestos de esta invención contienen un grupo sulfamido ($-\text{SO}_2\text{-NH}_2$) enlazado a un radical aromático, heterocíclico o aromático-heterocíclico. Los compuestos de esta clase de sustancias tienen, en posición ‘para’, el grupo amino o uno convertible en él. El procedimiento permite producir derivados en los compuestos de esta serie si, en ellos, se sustituye un átomo de hidrógeno en el grupo sulfamido por un residuo de acilo; responden a la fórmula general: $\text{R-SO}_2\text{-NH-X}$, donde R se corresponde con un residuo aromático, heterocíclico o aromático-heterocíclico con, al menos, un grupo amino en el núcleo o un grupo convertible en él; y X alude a un sustituyente de acilo. Estas sustancias son insolubles pero, reemplazando el hidrógeno del grupo acilo por un metal alcalino, se obtienen sustancias solubles en agua y con reacción neutra, lo que permite administrarlas en forma de inyecciones intravenosas o subcutáneas.

Los autores distinguen dos grupos principales de métodos de producción de estos compuestos²⁵:

- Aquéllos en que se forma previamente el grupo $\text{R-SO}_2\text{NH-}$ y, con posterioridad, se introduce el grupo acilo²⁶. En éstos, más sencillos, la acilación

²⁴ AHOEPM, patente 146.561. La memoria descriptiva consta de 33 hojas, mecanografiadas, numeradas y escritas por una sola cara; queda firmada, en Madrid, a 2-III-1939; como domicilio figura el número 170/172 de la Muellerstrasse de Berlín. La empresa tenía gran experiencia sobre estos productos; en la memoria que nos ocupa remite a las patentes alemanas 607.337, 610.320 y 638.701; a las patentes británicas 482.576 y 462.765; a las patentes suizas 192.699 y 192.700; a las patentes USA 2.111.768 y 2.111.913 y a las patentes francesas números 812.053 y 820.546. La patente de invención fue aprobada el 11-XII-1940 y hecha pública el 1-III-1941.

²⁵ En la memoria que acompaña a la solicitud de patente, los autores ilustran su procedimiento con una serie de ejemplos, algunos de difícil interpretación, otros incompletos, que quedan explicitados en el expediente: síntesis de 4-amino-benceno-sulfacetil-amida; síntesis de 4-propionil-amino-benceno-sulfo-propionil-amida; síntesis de 4-acetil-amino-benceno-sulfo-benzoil-amida; síntesis de 4-bencil-amino-benceno-sulfacetamida; síntesis de 3-nitro-benceno-sulfo-cetamida; síntesis de 4,4'-acetil-amino-benceno-sulfamido-benceno-sulfacetamida; síntesis de 4-acetil-amino-benceno-sulfamida-3'-benceno-sulfacetil-amida; síntesis de 4-acetil-sulfamido-benceno-2',4'-diamino-1,1'-azobenceno; síntesis de 4-amino-benceno-sulfacetil-amida; síntesis de 4-amino-benceno-sulfacetamida-glucósido; síntesis de 4,4'-disulfo-acetamida-difenil-urea; síntesis de 4-amino-benceno-sulfo-nicotoil-amida [*sic*]; síntesis de 4-amino-benceno-sulfo-butirol-amida; síntesis de 4-amino-benceno-sulfo-crotil-amida; síntesis de 4-acetil-amino-benceno-sulfo-para-nitrobenzoil-amida; síntesis de 4-bencil-amino-benceno-sulfo-acetil-amida; síntesis de 4-acetil-sulfamido-fenil-azo-1' [ácido disulfónico de naftol-6'.8']; síntesis de 4-amino-benceno-sulfo-propionil-amida; síntesis de 1,4-amino-benceno-sulfo-fenacetil-amida; síntesis de la amida del ácido 4-carboxi-amino-benceno-sulfo-amino-acético; síntesis de la amida del ácido 4-amino-benceno-sulfo-salicílico; síntesis de 4-amino-benceno-sulfo-roil-amida; síntesis de la amida del ácido 4-amino-benceno-sulfo-hidrocáulico; síntesis de la diamida del ácido 4,4'-diamino-difenil-disulfo-adipínico; síntesis de la diamida del ácido 4,4'-diamino-difenil-disulfo-múico; síntesis de 4-amino-sulfo-carboxi-amida; síntesis de 4-carboxi-amino-benceno-sulfo-carboxi-amida; síntesis de las sales de 4'-amino-benceno-sulfo-acetamida; síntesis de la sal cálcica de la 4-amino-benceno-sulfo-propionil-amida; síntesis de la sal magnésica de 4-amino-benceno-sulfo-roil-amida; síntesis de la sal sódica de 4-amino-benceno-sulfonil-amida; síntesis de la sal magnésica de 4-amino-benceno-sulfo-acetamida-glucósida; síntesis de la sal sódica de 4,4'-amino-benceno-sulfo-amino-benceno-sulfo-acetamida; síntesis de la sal de 4-bencil-amino-benceno-sulfo-acetamida; síntesis de la sal sódica de 4-acetil-sulfamido-2',4'-diamido-1,1'-azobenceno; síntesis de 2-amino-piridina-5-sulfo-acetamida; y síntesis de la 4-acetil-sulfamido-benceno-1,1'-azo-2',6'-diamino-piridina.

²⁶ Los autores señalan que este método tiene su justificación en la patente alemana 556.798, en donde se establece el procedimiento por el que el grupo amino, fijado nuclearmente antes de la acilación, es convertido en un grupo acilamino, más fácilmente reducible que el grupo amino; y en las patentes alemanas 607.537 y 610.320, donde quedan descritos los métodos mediante los cuales los compuestos de amino-sulfamida, inicialmente aromáticos, heterocíclicos o aromáticos-heterocíclicos, se acilan en el grupo de la sulfamida, diazotando luego el grupo amino combinado al núcleo.

se realiza de manera exhaustiva, acilando el grupo sulfamido y todos los grupos amino que existan, mediante el empleo de un exceso de agente de acilación. El grupo amino que se encuentra en el núcleo antes de la acilación puede ser convertido en grupo acilamino; posteriormente, por hidrólisis, queda libre el grupo amino, sin afectar a la sulfamida acilada.

- Aquéllos en que se forma previamente el grupo -NH-X y, luego, se introduce el grupo R-SO_2 . Pertenecen a este grupo los métodos mediante los cuales los ácidos sulfónicos o sus derivados, que contienen un grupo amino en el núcleo o un grupo convertible en él (principalmente sus halogenuros, en particular los sulfa-cloruros), se hacen reaccionar con amidas ácidas en presencia de condensadores o catalizadores²⁷.

En definitiva, la característica fundamental de esta invención consiste en la síntesis de compuestos de sulfamida acilada, de fórmula general $\text{R-SO}_2\text{-NH-X}$, así como sus derivados metálicos, los cuales se pueden emplear tanto como agentes terapéuticos como para la fabricación de agentes fito-protectores.

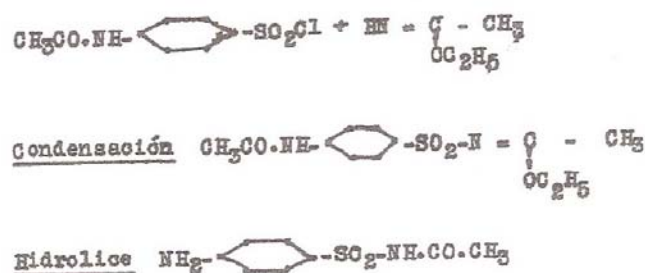
Esta patente tuvo, al menos, dos certificados de adición; el primero, por veinte años, fue solicitado por la empresa *Schering A.G.* el 30 de enero de 1941²⁸; en la patente principal -a la que ésta hace referencia- los autores describieron las sulfamidas aciladas en el grupo sulfamido; ahora manifiestan que es posible obtener las combinaciones citadas por copulación de sulfamidas diazoadas aciladas en el grupo sulfamido, con combinaciones aromáticas capaces de ser copuladas, heterocíclicas o aromático-heterocíclicas, ácidos naftol-sulfónicos, amino-piridinas y similares. Esto permite obtener derivados de las sulfamidas que tienen igual actividad terapéutica que las sulfamidas preparadas por la patente principal, y responden a la fórmula general: $\text{R-SO}_2\text{-NH-CO-R'}$ [R es un radical aromático, heterocíclico o aromático-heterocíclico con un grupo azo, que -a su vez- contiene también un radical aromático, heterocíclico o aromático-heterocíclico; R' es un radical orgánico de hidrocarburo]. En este primer certificado de adición se suprime la saponificación parcial, necesaria en el método protegido por la patente principal, es decir elimina la preparación del grupo amino unido al núcleo. Las sulfamidas aciladas que pueden emplearse en este proceso son las indicadas en la patente principal. Estas amino-sulfamidas aciladas en el grupo sulfamido pueden condensarse en azo-combinaciones con nitro-combinaciones aromáticas, heterocíclicas y también aromático-heterocíclicas. Se pueden reducir a azo-combinaciones las correspondientes combinaciones azoxi, que se preparan por condensación de combinaciones nitro o nitroso de sulfamidas acíclicas y combinaciones aromáticas, heterocíclicas o aromático-heterocíclicas²⁹.

²⁷ Este proceso comprende dos fases: las sulfamidas que contienen un grupo convertible en grupo amino se acilan primero y luego se introduce el grupo amino, como por ejemplo la acilación de la para-nitro-benceno-sulfamida, con la subsiguiente reducción del grupo nitro al grupo amino. Puede estar presente cualquier grupo que se pueda convertir en grupo amino; por ejemplo: grupos nitroso, azo, azoxi, hidrazo, halógeno, grupos acilaminos y azo-metinos, etc.

²⁸ AHOEPM, patente 151.608. Certificado de adición por "Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal número 146.561"; la memoria consta de cinco hojas escritas por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 30-I-1941; como domicilio de la empresa figura, Berlín-N 65 (Alemania) Müllerstrasse, 170/172. Este certificado fue concedido el 28-V-1942 y publicado el 1-III-1943.

²⁹ El autor propone una serie de ejemplos, entre ellos el que relatamos: obtención de 4-acetisulfamido-benzol-2'.4'-diamino-1-1'-azobenzol; para ello parte de una cantidad de 21,4 g. de 4-amino-benzol-sulfacetamida, los cuales se diazotan en disolución clorhídrica con nitrito sódico; se enfría la

Un nuevo certificado de adición a esta patente fue presentado, por *Schering A.G.*, el 29 de julio de 1943³⁰. Las sulfamidas aromáticas aciladas en el grupo sulfamido, en la posición ‘para’ respecto a este grupo, contienen un grupo amino o, en su defecto, otro convertible en él; éstas han sido preparadas por acilación directa del grupo sulfamido³¹. En esta nueva modificación se defiende que estas combinaciones también pueden obtenerse cuando se hacen reaccionar con imidoéteres, ácidos sulfónicos de la serie aromática o sus derivados reactivos -en especial los halogenuros benzolsulfónicos-, que en posición ‘para’ respecto al grupo sulfónico contienen un grupo amino o un grupo convertible en éste. Para separar la combinación imidoéteres, se hidroliza el producto de la reacción y, simultáneamente o después, se obtiene libre el grupo amino unido al núcleo³².



Finalizado el conflicto bélico español, el 16 de enero de 1940, el consorcio alemán, *I.G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft*, presento, ante el registro de patentes, un “Procedimiento para la obtención de compuestos sulfamídicos”³³. Los autores

disolución del cloruro de diazonio; a continuación se trata con una solución clorhídrica de 11 g. de m-fenilo-diamina. El producto formado en la copulación se separa como precipitado de color rojo oscuro, que se recoge por aspiración, y se adiciona a una disolución diluida de carbonato sódico; se filtra esta disolución y se acidula con ácido acético en caliente; el colorante es segregado en forma de hojitas rojo-azuladas de brillo metálico.

³⁰ AHOEPM, patente 162.528. La memoria de este certificado de “Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal número 146.561” consta de cinco hojas foliadas y escrita a máquina por una sola de sus caras; está fechado en Madrid, a 29-VII-1943, como domicilio social de la empresa consta Berlín N. 65 (Alemania). Müllerstrasse 170/172. El certificado fue concedido de inmediato, el 30-VII-1943, aunque no fue hecho público hasta el 1-III-1944.

³¹ En la memoria se alude a una patente francesa, patente 868.714, sin duda propiedad de esta misma empresa.

³² La memoria incluye una serie de ejemplos, de entre los que exponemos uno: 26,4 g. de cloruro del ácido carboxi-sulfanílico, con 13,8 g. de hidrocloreto de propionimidoéter, disueltos en 60 cm³ de piridina seca, se calientan durante dos horas al baño María; la disolución, de color amarillo claro, se diluye con una cantidad de agua cinco veces mayor que la de la disolución; se acidula con ácido clorhídrico y se obtiene un precipitado de propionimidoéter del ácido carboxi-sulfanílico que, cristalizado en alcohol diluido, presenta un punto de fusión de 115°-117° C. El éter se calienta con lejía potásica alcohólica, separándose la sal potásica de la propionilamida del ácido carboxi-sulfanílico que, al calentarla con lejía 2 N, se saponifica en propionalamida del ácido sulfanílico. La amida, después de ser disuelta en alcohol diluido, funde a 134°-135° C. Se obtienen del producto 18 g., lo que supone un rendimiento del 79% frente al teórico.

³³ AHOEPM, patente 147.802; la memoria descriptiva consta de siete hojas, mecanografiadas, numeradas y escritas por una sola cara; está fechada en Madrid, a 16-I-1940, como domicilio de la empresa consta Frankfurt a. Main (Alemania). La memoria había sido presentada, en Alemania, con fecha

señalan que es posible la obtención de nuevos compuestos de valor químico-terapéutico al preparar los compuestos de las 4-amino-metil-benzol-sulfamidas en las cuales el grupo amínico del radical sulfamídico puede derivarse del amoniaco y de las diversas aminas orgánicas primarias o secundarias, por ejemplo de las aminas heterocíclicas. Estos grupos de amida, o sus sustituyentes, pueden llevar otros grupos más, como son los grupos amínicos o hidroxílicos libres o sustituidos o radicales acíclicos.

Comparados con la 4-amino-benzol-sulfamida (con grupo amínico aromático), los compuestos del tipo que se estudian poseen una mayor solubilidad en agua y, además, las soluciones de sus sales con ácidos minerales ya no muestran reacción al rojo congo. Para preparar estos compuestos, los autores operan con benzol-sulfamidas que tienen en su posición 4 un radical metílico, el cual contiene un sustituyente reactivo transformable en el grupo amínico; proceden así:

- Saponifican las diversas 4-acil-metil, 4-uretano-metil- o isocianato-metil-benzol-sulfamidas.
- Reducen las 4-nitro-metil-benzol-sulfamidas u otras 4-metil-benzol-sulfamidas, sustituidas por nitrógeno en el grupo 4-metílico.
- Tratan las 4-halógeno-metil-benzol-sulfamidas, 4-oximetil-benzol-sulfamidas o sus derivados con amoniaco, o sustancias que desprenden amoniaco, como podría ser la hexametil-enotetramina, o descomponen los derivados de las 4-(carboximetil)-benzol-sulfamidas formando, por tanto, las 4-amino-metil-benzol-sulfamidas.

En las 4-amino-metil-benzol-sulfamidas, en cuyo metílico un átomo de hidrógeno está sustituido por el grupo carboxílico, por calentamiento (a una temperatura superior a su punto de fusión), se elimina este grupo carboxílico. También es posible proceder de manera que en benzol-sulfamidas que presentan en la posición 4 un radical que contiene carbono y nitrógeno (que es transformable en el grupo amino-metílico) y que se encuentra unido al núcleo bencílico, se transforme dicho radical en el grupo amino-metílico. El grupo amino-metílico de las benzol-sulfamidas que tienen en posición 4 el radical de un derivado nitrogenado de aldehído (como en compuestos del tipo de benzol-doxinas o hidrazonas de benzaldehídos), se puede reducir por vía catalítica, electrolítica o por medio de amalgama o metal alcalino, cinc, estaño, sales estannosas y compuestos cromosos. Puede partirse directamente de los aldehídos, transformando el grupo aldehídico con amoniaco o sus productos de sustitución³⁴, como son las hidroxilaminas o las hidracinas, y reduciendo los productos que se forman³⁴.

Por último, señalan los autores que las 4-amino-metil-benzol-sulfamidas pueden obtenerse reduciendo 4-ciano-benzol-sulfamidas o benzol-sulfamidas que tienen un radical de un derivado nitrogenado del ácido carboxílico, por ejemplo 4-carboxi-amido, 4-carboxi-tioamida o 4-carbamidino-benzol-sulfamidas. La introducción del grupo sulfamido puede hacerse condensando, según la reacción de Friedel-Crafts y en presencia de catalizadores, el 4-amino-metil-benzol en posición 1 con halogenuros amino-sulfónicos di-sustituidos. También es posible la introducción de este grupo, según se indica en la memoria, haciendo reaccionar los ésteres o halogenuros 4-amino-

27-I-1939 (patente alemana J-63-629-IVc/12q). La patente española, de invención, fue aprobada el 13-III-1941 y hecha pública el 16-IX-1941.

³⁴ Dichos procesos pueden realizarse tratando el aldehído con una sustancia que sirva también de dador de amoniaco, como es el formiato amónico o el ácido amino-acético.

metil-benzol-sulfónicos (a ser posible protegidos en el grupo amínico), con amoniaco, eliminando a continuación el radical protector³⁵.

En febrero de 1940 los farmacéuticos José Andreu Miralles y Juan Andreu Miralles³⁶, domiciliados en Barcelona, probablemente en representación de los *Laboratorios Dr. Andreu*, presentaron a registro una solicitud de patente para “Procedimientos en la obtención de la p-amino-benceno-sulfamida”³⁷. Los autores proponen una alternativa al método clásico desarrollado por Paul Gelmo³⁸, que parte del acetyl-sulfanilato de sosa tratado con pentacloruro de fósforo; en su opinión, el método de Gelmo presenta, como inconvenientes, la difícil obtención del acetyl-sulfanilato de sosa y los problemas derivados de disolver en éter el cloruro del ácido acetyl-sulfanílico. Para solventarlos recurren a un procedimiento ya conocido en la fecha de presentación de esta patente: consistía en el tratamiento de la acetanilida (en general una anilida) con ácido clorosulfónico para obtener el cloruro del ácido acetyl-sulfanílico; el cual, en presencia de amoniaco, se transforma en acetyl-sulfanil-anilida, un producto que luego se hidroliza³⁹.

³⁵ En la memoria descriptiva se proponen un par de ejemplos; en el primero, una cantidad de 23 g. de amida del ácido 4-acetyl-amino-metil-benzol-sulfónico se mezclan con 60 cm³ de lejía de sosa cáustica al 20%; esta mezcla se hierve durante una hora. La solución obtenida es tratada con negro animal (carbón hecho con huesos calcinados) y se filtra por aspiración. El filtrado obtenido es tratado con cloruro amónico, así se forma y precipita la amida del ácido 4-amino-metil-benzol-sulfónico. La mezcla se enfría y se filtra por aspiración. El precipitado que se obtiene se lava con agua helada. Se vuelve a cristalizar en agua o bien en alcohol metílico, obteniéndose el nuevo producto en forma de cristales incoloros.

En el segundo ejemplo, una cantidad de 15 g. de metilamida del ácido 4-acetyl-amino-metil-benzol-sulfónico, es mezclada con 60 cm³ de lejía de sosa cáustica al 20% y, como en el caso anterior, la nueva mezcla se hierve durante una hora. Se deja enfriar la mezcla y las impurezas que contiene se eliminan por filtración al vacío. El precipitado se trata con cloruro amónico y se precipita la metilamida del ácido 4-amino-metil-benzol-sulfónico formada; se separa por aspiración y se vuelve a cristalizar en agua en forma de cristales incoloros.

³⁶ Los hermanos Andreu Miralles continuaron el negocio familiar establecido por su padre Salvador Andreu Grau (1841-1928). José Andreu (Barcelona, 1891- Barcelona, 1978) se licenció en Farmacia por la Universidad de Barcelona (1910), en 1921 obtuvo el título de doctor por la Universidad Central; ejerció como subdelegado de farmacia de Barcelona en 1926; tras estallar la guerra civil, el 17-VII-1936, salió de España, vía Puigcerdá, para afincarse, junto a su hermano Juan, en Italia, desde donde organizaron el envío de productos sanitarios al Ejército franquista; desde septiembre de 1938 estuvo en España; fue académico correspondiente de la Real Acadèmia de Farmàcia de Catalunya. Juan Andreu (Barcelona, 1894 - Barcelona, 1968) obtuvo el grado de licenciado en Farmacia en 1914, y el de doctor en 1919; en 1962 dispuso de oficina de farmacia en Barcelona; falleció en julio de 1968; de su entierro dio extensa cuenta *La Vanguardia* [12-VII-1968: 23] (Rafael ROLDÁN GUERRERO. *Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles*. Madrid: IMPHOE, 1958-1963. 4 vols.; sobre José Andreu cf. vol. 1: 174; sobre Juan Andreu cf. vol. 1: 174-175. Ramón JORDI I GONZÁLEZ. *Colección de 'speciers', mancebos boticarios, boticarios, farmacéuticos practicantes de farmacia y farmacéuticos en Cataluña (1207-1997)*. Barcelona: Fundación Uriach, 2003; sobre José Andreu cf. pág. 776; sobre Juan Andreu cf. pág. 773),

³⁷ AHOEPM, patente 149.121; la memoria descriptiva consta de cuatro hojas foliadas, numeradas, mecanografiadas y escritas por una sola de sus caras; queda firmada, en Barcelona, el 19-II-1940. El expediente se presenta en solicitud de una patente de invención; ésta fue concedida el 8-X-1941 y publicada el 1-V-1942.

³⁸ Cf. Waldemar KAEMPFERT. “News of Dr. Paul Gelmo, Discoverer of Sulfanilamide”. *Journal of the History of Medicine and allied Sciences*, 5: 213-214. Oxford, 1950.

³⁹ La acetyl-sulfanil-amida se hidroliza por ebullición con ácido clorhídrico de densidad 1.10, lográndose la separación del grupo acetilo.

El método descrito resulta, aún, poco satisfactorio, debido a su bajo rendimiento, ya que la hidrólisis de la acetil-sulfanil-amida en medio ácido es muy molesta. Los autores perfeccionan este método realizando la reacción a temperatura lo más baja posible, con lo cual se aumenta el rendimiento y se evita la formación de gran cantidad de sulfonas inútiles. El método propuesto es el siguiente: en un recipiente apropiado, provisto de un mecanismo de agitación, se introducen 8 partes de ácido clorosulfónico y, mientras se agitan, se añaden lentamente 3,2 partes de acetanilida. La reacción ha de producirse a la temperatura más baja posible y procurando que no haya nunca una cantidad apreciable de acetanilida sin reaccionar. Es preciso descomponer el exceso de ácido clorosulfónico añadido, para lo cual se vierte el producto en un recipiente que contiene hielo triturado; este recipiente está enfriado exteriormente para lograr que la temperatura de la masa sea siempre menor de 15°; terminada la descomposición del ácido clorosulfónico libre, el producto se filtra y escurre, lavándolo a continuación. El cloruro del ácido acetil-sulfanílico se hace reaccionar con amoníaco, no habiendo necesidad de disolverlo en éter; como es posible que se forme ácido sulfanílico si la temperatura se eleva, es necesario operar en una vasija que se enfríe exteriormente. El producto que se obtiene de esta reacción es la acetil-sulfanil-amida, que se escurre, lava y seca; a continuación se separa el grupo acetilo de la acetil-sulfanil-amida por hidrólisis, obteniéndose la para-amino-bencen-sulfamida, la cual se recrystaliza hasta conseguir que resulte pura.

La hidrólisis de la acetil-sulfanil-amida puede efectuarse por ebullición con ácido clorhídrico de densidad 1,10 ó por cualquier otro procedimiento. Los autores de la patente recomiendan que se haga por medio de un álcali, lo cual “es objeto de otra patente de invención de los mismos solicitantes”, según señalan.

El 8 de enero de 1941 la empresa suiza *Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel* presentó, ante el registro español, una patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento para la obtención de nuevas sales de derivados de benzol-sulfamida”⁴⁰. El método permite obtener sales derivadas de benzol-sulfamida, reemplazando en la sulfamida un átomo de hidrógeno del grupo sulfamídico por un radical heterocíclico, sustituido o no; el núcleo de ella está sustituido, por lo menos, por un grupo amínico o por un grupo susceptible de ser transformado en tal⁴¹.

El método de preparación de estas nuevas sales consiste en disolver las benzol-sulfamidas en una cantidad calculada de un hidróxido alcalino o alcalino-térreo, en presencia de agua o de un disolvente orgánico; el nuevo compuesto se aísla por medio de alcohol o éter⁴². Algunas de las sales así obtenidas, por ejemplo las sales cálcicas,

⁴⁰ AHOEPM, patente 151.403; la memoria descriptiva de esta patente consta de 5 páginas mecanografiadas, numeradas y escritas por una cara; está fechada en Madrid, a 8 de enero de 1941. La patente de invención fue concedida el 20-V-1942 y hecha pública el 1-III-1943.

⁴¹ Podrían servir de primeras materias: 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-tiazol, 2-[p-amino-sulfamido]-tiazol, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-benzotiazol, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-piridina, 3-[p-amino-benzol-sulfamido]-acridina, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-quinolina, 4-[p-amino-benzol-sulfamido]-quinolina, 6-[p-amino-benzol]-quinolina, 8-[p-amino-benzol-sulfamido]-quinolina, 8-[p-amino-benzol-sulfamido]-6-metoxi-quinolina y similares.

⁴² Asimismo, podrían obtenerse las nuevas sales mediante doble reacción de las sales alcalinas de las benzol-sulfamidas con sales alcalino-térreas como, por ejemplo, cloruro de bario o sulfato magnésico, eventualmente sin acilar con anterioridad las sales alcalinas. En lugar de las sales alcalinas también se podrían emplear sales con bases orgánicas, como amino-ciclohexanol o amino-etanol.

muestran una buena solubilidad en agua y tienen, en comparación con las sales alcalinas, un efecto alcalino menos pronunciado. Las sales de calcio de los derivados de tiazol son fácilmente solubles, por esta razón el empleo de estas sales tiene interés para su utilización en inyectables; pueden también utilizarse mezclas de las sales, por ejemplo sales de calcio y de magnesio. Las sales cálcicas de los derivados de tiazol poseen igual eficacia y un efecto tóxico menor que los compuestos correspondientes no transformados en sales.

El 28 de febrero de 1941, esta misma empresa suiza, *Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel*, presentó en el registro español otra patente de invención, ésta bajo el título de “Procedimiento para la obtención de nuevos derivados de benzol-sulfamida”⁴³. La empresa informa que es posible obtener derivados hidroxilámicos de la serie de benzol-sulfamido-tiazol si se hacen reaccionar agentes reductores sobre el nitro de nitroso-derivados; también si actúan agentes oxidantes sobre el grupo amino de los derivados N-mono-sustituídos de dicha serie⁴⁴. Este método emplea como materias primas aquellos benzol-sufonamido-tiazoles cuyo núcleo de benzol posee, especialmente en posición ‘para’, un grupo nitro, nitroso, amino, alquilamino o acilamino, y cuyo radical tiazólico puede contener sustituyentes⁴⁵. Los compuestos obtenidos según este procedimiento son sales solubles y, según señalan los autores de la patente, particularmente eficaces contra las enfermedades infecciosas.

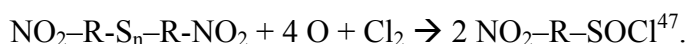
Siguiendo esta línea de desarrollo, el 20 de diciembre de 1943, Clemente Sierra presentó una patente de invención para proteger un “Procedimiento para la obtención de amino-benzol-sulfamidas”⁴⁶. El autor era conocedor de la posibilidad técnica de obtener los tres isómeros del producto químico amino-benzol-sulfamida a partir de los respectivos poli-sulfuros de di-(nitro-benzol) mediante la oxidación y cloración simultáneas, como se indica en la reacción:

⁴³ AHOEPM, patente 151.993; la memoria descriptiva de esta patente consta de 5 hojas, escritas por una sola cara, fechadas en Madrid, a 28 de febrero de 1941. Esta patente de invención fue aprobada el 12-VI-1942 y hecha pública el 1-III-1943.

⁴⁴ Se puede proceder a la reducción o a la oxidación según los métodos conocidos para la obtención de las aril-hidroxil-aminas; los autores citan como referencia los textos de Victor von RICHTER, Richard ANSCHUTZ. *Chemie der Kohlenstoffverbindungen, oder Organische Chemie*. 12. Aufl. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1928-1935. 3 vols. (vol. 2: 78-80. 1935) y Josef HOUBEN (ed.). *Die Methoden Der Organischen Chemie*. 3rd ed. 2. Special part. Leipzig: verlag Georg Thieme, 1925 (págs. 175-178; 403-409). Para la reducción de los grupos nitro a nitroso se emplea polvo de cinc, amalgamas tales como la amalgama de cinc o aluminio-, sulfuros de amonio o alcalinos; asimismo podría utilizarse el método de reducción electrolítica o catalítica; particularmente adecuada resulta la reducción por medio de hidrógeno en presencia de catalizadores del grupo, como paladio, níquel o cobalto.

⁴⁵ Según este procedimiento se pueden obtener, entre otros, los siguientes compuestos: 2-[p-hidroxil-amino-benzol-sulfamido]-tiazol, 2-[p-hidroxil-amino-benzol-sulfamido]-4-metil-tiazol y 2-[p-hidroxil-amino-benzol-sulfamido]-4.5-dimetil-tiazol, entre otros.

⁴⁶ AHOEPM, patente 155.394. La memoria descriptiva consta de tres páginas escritas a máquina por una sola cara, queda fechada en Madrid, a 20 de diciembre de 1941; la empresa estuvo domiciliada en Bilbao; no poseemos datos sobre la compañía a la que pudiera representar, parece que fue éste el único expediente de patente que remitió a registro. La patente de invención solicitada fue concedida el 20-X-1942 y publicada el 1-III-1943.



El cloruro de ácido obtenido, según este autor, se puede transformar, mediante la acción del amoníaco, en la correspondiente amida: $\text{NO}_2\text{-R-SO}_2\text{NH}_2$ que, al ser reducida, origina la amino-benzol-sulfamida deseada: $\text{HN}_2\text{-R-SO}_2\text{-NH}_2$ ⁴⁸.

Con fecha de 22 de enero de 1942, el *Instituto Farmacológico Latino* S.L.⁴⁹ presentó a registro una solicitud de patente para proteger “Un procedimiento para obtener la reacción entre sulfohalogenuros amino-bencénicos y aminas primarias substituidas aplicable a la preparación de sustancias medicinales llamadas vulgarmente sulfamidas”⁵⁰. Aunque la obtención de sulfamidas era ya comúnmente descrita en los tratados de Química orgánica, los autores mantienen que, en los métodos publicados, se prescinde de muchos detalles imprescindibles para una aplicación industrial adecuada; el procedimiento que el inventor quiere proteger con esta patente, aunque de uso general y conocido, presenta detalles peculiares que él atribuye a su propia invención.

El procedimiento que describe consiste en preparar el ácido sulfanílico por acción del ácido sulfúrico concentrado sobre la anilina, y deshidratación por medio del calor; este ácido tiene sus grupos ácido y amino en posición ‘para’; de este ácido se obtiene el halogenuro correspondiente y, por acción del mismo -en este caso del cloruro-, sobre las aminas primarias, se logra el compuesto deseado por reacción con una amina primaria sustituida; pero, aclaran los autores, si esta reacción se practica directamente no se obtiene una reacción simple y en un solo sentido, sino que los diversos compuestos posibles aparecen, en mayor o menor cantidad y, si se tiene en

⁴⁷ El autor no especifica el significado de los símbolos ‘R’ escritos en la fórmula general de la sustancia reactiva; en la reacción que expone considera que el oxígeno actúa en estado naciente; tampoco aclara los posibles valores de ‘n’.

⁴⁸ Dos ejemplos prácticos completan la información proporcionada por esta patente: una solución de 200 g. de poli-sulfuro de p-di-nitro-benzol, en una mezcla de 1.000 cc. de ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico, se somete a una corriente de cloro -esa corriente de cloro está reforzada, pues la mezcla indicada produce cloro naciente-; la mezcla se calienta a 100° C hasta que el poli-sulfuro se transforma en un líquido oleoso de color amarillo; entonces se suprime la corriente de cloro y la calefacción, se recoge por decantación el cloruro ácido para-nitro-benzol-sulfónico; este cloruro se vierte sobre 175 cc. de amoníaco al 20%; enfriando, se separan 140 g. de para-nitro-benzol-sulfamida; el grupo nitró de este compuesto se reduce a amino, con polvo de hierro, en agua acidulada con ácido clorhídrico concentrado; este grupo amino se alcaliniza fuertemente con sosa para disolver la amino-benzol-sulfamida; luego se separa el líquido por filtración y, de éste, se precipita la sulfamida disuelta por neutralización con ácido clorhídrico. En el segundo ejemplo se opera de manera similar al que hemos comentado; parte de los poli-sulfuros de orto o meta di-nitro-benzol, para obtener la orto o meta amino-benzol-sulfamida, respectivamente.

⁴⁹ El *Instituto Farmacológico Latino* S.L. sería adquirido por la compañía Syntex en 1966 (cf. “Incorporación de Syntex a la industria farmacéutica española”. *ABC*, 3-V-1966, pág. 88. Madrid, 1966), con motivo de la absorción, en la prensa diaria se valora al *Instituto Farmacológico Latino* S.L. con un “capital de 120 millones de pesetas, con cerca de 600 técnicos y empleados y con una organización de venta y propaganda que, aparte de dos revistas, cuenta con más de 120 visitantes médicos especializados (...) con su línea de más de 60 especialidades farmacéuticas éticas -antibióticos, vitaminas, esteroides de acción hormonal, psicofármacos, etc.-“. La empresa fue fundada por Angelo Barale y Sebastiano Giuseppe Bergele (m. París, 1990).

⁵⁰ AHOEPM, patente 155.966; la memoria consta de cuatro hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara; está fechada en Barcelona, a 13-I-1942. Pese a la localidad indicada en la firma de la memoria, figura como domicilio social del *Instituto Farmacológico Latino* S.L. el número 25 de la madrileña calle de Serrano. La patente fue aprobada el 11-I-1943, se hizo pública el 1-IV-1943.

cuenta que los derivados del ácido sulfanílico tienen los dos caracteres, ácido y básico, se comprende la complejidad del resultado obtenido. Los autores, para resolver la dificultad que presenta el procedimiento general conocido, indican que basta con disolver los dos cuerpos cuya reacción se pretende en disolventes apropiados y comunes a ambos, como piridina, acetona o di-metil-anilina, entre otros⁵¹.

El 18 de abril de 1942 la empresa alemana *Deutsche Hydrierwerke A.G.* presentó, ante el registro español, una patente de invención destinada a proteger un "Procedimiento para obtener derivados de sulfamidas cíclicas", similar a la que, meses antes, había sido registrado ante la administración germana⁵². Los autores parten de la posibilidad de conseguir combinaciones de sulfamidas cíclicas, de fórmula general $(H_2N.R.SO_2.NH.R'.SO_2.NX_n)-R''$ [donde R y R' se corresponden con un residuo aromático, R'' con un sistema anular heterocíclico, X con un hidrógeno o un residuo de hidrocarburo, y n con los números 1-3], cuando se hacen reaccionar ácidos sulfónicos de fórmula general $G.R.SO_2.NX.R'.NX.R'.SO_3H$ [G indica un residuo que se puede convertir en un grupo amínico] con combinaciones amino-sustituidas; o bien, si se tratan combinaciones amínicas de fórmula general $(H_2N.R.SO_2.NX)-R''$, con ácidos sulfónicos capaces de reacción⁵³. Estos ácidos sulfónicos, o sus derivados, se hacen influir sobre combinaciones heterocíclicas amino-sustituidas que se pueden derivar de sistemas anulares heterocíclicos aislados o condensados⁵⁴. La transformación entre ácidos sulfónicos, o sus derivados, y los derivados amínicos heterocíclicos se realiza siguiendo técnicas conocidas; en la memoria se señala que, si fuese necesario, se pueden usar agentes de condensación, por ejemplo, catalizadores.

Otra forma de ejecución del proceso es partiendo de combinaciones amínicas de fórmula general $(H_2N.R'.SO_2.NX_n)-R''$ y transformarlas con ácidos, o sus derivados, de fórmula general $G.R.SO_3H$. Asimismo, las combinaciones amínicas de fórmula general $(H_2N.R'.SO_2.NX_n)-R''$ se pueden obtener, de acuerdo con las indicaciones de este

⁵¹ En un intento de facilitar la comprensión de su procedimiento, los autores mencionan dos casos de aplicación práctica: en la reacción del sulfocloruro amino-bencénico y una amina primaria sustituida -señala el caso de amino-4-metil-tiazol-, se disuelven ambos cuerpos, en proporciones estequiométricas, en cantidades adecuadas de piridina o acetona; también de igual manera, en la reacción entre 2-amino-piridina y un compuesto amínico del sulfocloruro bencénico, se disuelven ambos cuerpos, en proporciones estequiométricas, en di-metil-anilina, manteniendo durante la reacción -como en el caso anterior- la temperatura alrededor de 40° C. En ambas situaciones, realizada la reacción, se separa y purifica el producto obtenido.

⁵² AHOEPM, patente 156.775; esta memoria consta de nueve hojas escritas por una sola cara; el documento queda fechado, en Madrid, a 18 de abril de 1942; como domicilio social de la empresa se hace constar Rodleben bei Dessau-Rosslau (Alemania). Esta solicitud se corresponde con otra similar, presentada ante la Administración alemana el 28 de junio de 1941, patentada bajo el número D.85.361 IVc/12q. La patente española, de invención, fue aprobada el 9-II-1943 y publicada el 1-IV-1943.

⁵³ Como sustancias de partida, de fórmula general $G-R-SO_2-NH-R'-SO_3H$, puede emplearse, por ejemplo, el cloruro de 4-(4'-acetil-amino-benzo-sulfamido)-benzol-sulfónico; en lugar de los haluros de ácido sulfónico pueden utilizarse, también, los mismos ácidos sulfónicos o sus correspondientes ésteres.

⁵⁴ Estos derivados amínicos heterocíclicos son, entre otros: 4-amino-pirazol, 5-amino-pirazol, 3,5-diamino-pirazol, amino-antipirina, 3-amino-indazol, 5-metil- ó 5,7-di-metil-3-amino-indazol, 2-amino-imidazol, 2-amino-bencimidazol, 2-amino-benzoxazol, amino-diazoles, amino-furodiazoles, 2-aminotriazol, alfa-aminopirina, N-alquilamino-piridinas, amino-quinolinas, amino-isoquinolinas, 9-amino-acridina, amino-pirazina, amino-oxi-piridinas, amino-purinas, 1-amino-ftalacina, 4-amino-quinazolina, aminoquinoxalinas, amino-1,3,5-triacinas, amino-1,2,4-triacinas, aminotiadiacinas y 3-amino-1-5-naftiridina.

procedimiento, por la acción del cloruro 4-acetil-amino-benzol-sulfónico sobre derivados amínicos de combinaciones heterocíclicas, por ejemplo 2-amino-5-metil-tiadiazol y formación posterior del grupo amino⁵⁵.

Esta empresa alemana, *Deutsche Hydrierwerke A.G.*, amplió la información sobre las sulfamidas cíclicas al presentar, con fecha de 30 de abril de 1942, un nuevo expediente de patente destinado a proteger “Un procedimiento para la obtención de derivados de sulfamidas cíclicas”, muy similar al ya comentado, y basado en el mismo expediente alemán que aquel⁵⁶.

En este caso, los autores utilizan ácidos 4-amino-benzol-sulfónicos sustituidos en el nitrógeno por residuos que contienen dobles enlaces cíclicos, especialmente residuos aralquílicos, residuos acíclicos o derivados de ácidos sulfónicos, que se transforman con derivados amínicos de combinaciones heterocíclicas, de los que se disocia el residuo acíclico en los productos de transformación obtenidos. Los correspondientes halogenuros sulfónicos se obtienen aralquilizando anilina en el nitrógeno, introduciendo un residuo halógeno, nitro-bencílico o fenil-propílico; luego, la combinación aralquilizada en el nitrógeno, se trata con medios de acilación y, a continuación, se hace incidir ácido clorosulfónico sobre la combinación obtenida. En lugar de los halogenuros de ácidos sulfónicos pueden también emplearse, de acuerdo con la memoria que comentamos, los correspondientes ácidos sulfónicos o sus ésteres, así como derivados de los ácidos 4-amino-benzol-sulfónicos que, en lugar de los restos aralquílicos, contengan otros residuos con dobles enlaces cíclicos. La técnica de transformación entre los ácidos, o sus derivados, y los derivados heterocíclicos empleados en este procedimiento es idéntica a la indicada en el expediente de registro presentado por esta misma empresa, mencionado líneas arriba⁵⁷.

Con fecha de 25 de septiembre de 1942, la suiza *Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel* presentó una nueva patente de invención par proteger un

⁵⁵ En la memoria se ilustra este procedimiento con un ejemplo: 39 partes en peso de cloruro del ácido acetil-sulfanilil-sulfanílico y 11,5 partes en peso de 2-amino-5-metil-tiadiazol se disuelven en 100 partes de volumen de piridina y se calienta varias horas a 40°-50° C; se destila la piridina en el vacío; se recoge el residuo en 300 partes de volumen de ácido clorhídrico al 5% y se absorbe el producto. El resultado se lava con agua y se disuelve en 250 partes de volumen de lejía sódica 2 N. Después de una hora de ebullición en reflujo, se decolora con carbón animal y el filtrado se hace débilmente ácido por medio de un ácido mineral, con lo cual precipita el 2-sulfanilil-sulfanilamino-5-metil-tiadiazol.

⁵⁶ AHOEPM, patente 156.950; esta memoria consta de siete páginas escritas por una sola cara; el documento queda fechado, en Madrid, a 30 de abril de 1942; como en el caso anterior, en este expediente se hace referencia a la patente alemana D.85.364 I Vc/12q. La patente española, de invención, fue aprobada el 8-III-1943 y hecha pública el 1-IV-1943.

⁵⁷ Como en su procedimiento homólogo, la empresa expone un ejemplo aclaratorio: 33 partes en peso de cloruro del ácido n-bencil-acetil-4-aminobenzol-sulfónico y 10 partes de peso de 2-aminotiazol se disuelven en 100 partes en volumen de piridina; se calienta varias horas a 40°-50° C. La piridina se destila en el vacío después de terminada la transformación; el residuo se recoge en ácido clorhídrico al 5% diluido. El producto obtenido se disuelve en 250 partes en volumen de lejía sódica 2 N. La solución se hierve para separar el grupo acetílico y se decolora con carbón animal; se filtra y el filtrado se acidifica débilmente con ácido mineral, con lo cual precipita 2-(N-bencil-4-aminobenzol-sulfonilamino)-tiazol.

“Procedimiento para la obtención de derivados de p-amino-benzol-sulfamidas”⁵⁸; esta patente guarda una gran similitud con las otras presentadas por la misma empresa, aunque introduce algunas mejoras.

La empresa señala que, si se hacen reaccionar p-amino-benzol-sulfamidas, en las que un átomo de hidrógeno del grupo sulfamídico está sustituido por un radical poliheteroatómico-heterociclo, con aldehídos que contengan dos o más átomos de carbono y con bisulfitos, se forman productos de condensación⁵⁹; compuestos que contienen nitrógeno en el núcleo heterocíclico pueden estar también sustituidos en el nitrógeno del ciclo⁶⁰. La reacción ocurre al calentar las amino-benzol-sulfamidas con los aldehídos, formándose bases de Schiff, poniendo éstas en reacción con bisulfitos, por ejemplo con bisulfito sódico; se obtienen los mismos productos si se adicionan los aldehídos a las amino-benzol-sulfamidas, o si se mezclan entre si estas tres materias primas, calentándolas. Normalmente los compuestos obtenidos por este procedimiento son en forma de sales alcalinas solubles en agua y de reacción neutra, dando por lo tanto soluciones con interés terapéutico.

Habrá que esperar al 16 de junio de 1956 para que la firma española *Laboratorio Martín Cuatrecasas S.A.*⁶¹ presentara a registro un patente de invención destinada a proteger un “Nuevo método de preparación de sulfamidas”⁶². El método se refiere a un procedimiento para la obtención de derivados de la p-amino-benceno-sulfamida, de

⁵⁸ AHOEPM, patente 158.715; esta memoria descriptiva consta de ocho páginas mecanografiadas, escritas por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 25-IX-1942. Esta patente de invención fue aprobada el 25-III-1943 y hecha pública unos días después, el 1-IV-1943.

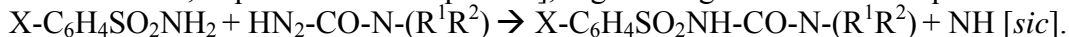
⁵⁹ Las materias primas empleados son p-amino-benzol-sulfamidas en las cuales un átomo de hidrógeno del grupo sulfamídico está sustituido por un radical poliheteroatómico-heterocíclico, del tipo de p-amino-benzol-sulfamido-tiazoles, tidiazoles, pirimidinas o pirazinas como 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-tiazol, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-4-metil-tiazol, 2-[p-amino-benzol-sulfamido], 4-metil-tiazol, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-4,5-dimetilo-tiazol, éster del ácido 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-4-alquilo-tiazol-5-carboxílico, éster del ácido 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-tiazol-4-acético, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-tiodiazol-(1,3,4), 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-5-metilo-tiodiazol, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-pirimidina, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-pirimidina, 2-[p-amino-benzol-sulfamido]-3,6-dimetilo-pirazina y similares.

⁶⁰ Son adecuados para la condensación los aldehídos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos con, al menos, dos átomos de carbono, como por ejemplo: acetaldehído, propionaldehído, isovaleraldehído, glucosa, acrolileína, crotonaldehído, benzaldehído, aldehído cinnámico, furfural y analogos, de los que la memoria técnica da abundantes ejemplos.

⁶¹ El *Laboratorio Martín Cuatrecasas* fue fundado, en torno a 1929, por Martí Cuatrecasas Arumí (Camprodon, Gerona, 1905 - Barcelona, 1966), inicialmente quedó instalado en la farmacia sita en la calle Pau Claris, 41 de Barcelona; desde él se comercializó *Salidol* y *Euforina*; en 1930 funcionó en el número 13 de la calle Ginebra, en Barcelona; ese mismo año se traslada al número 41 de la calle Pau Claris, en claro proceso de expansión, particularmente por el éxito de *Sali-Sod*; siguió activo tras la guerra civil, convertido ya en sociedad anónima, en 1956 ocupaba los locales del número 304 de la calle de Valencia, en Barcelona. Tras un impulso económico patrocinado por la familia Pujol, el *Laboratorio Martín Cuatrecasas S.A.* se transformó en *Laboratorio Fides S.A.*, estuvo instalado en el número 417 de la calle Vizcaya, en Barcelona (Josep CUATRECASAS I GENIS, María CUATRECASAS I ARUMÍ, Joan SUBIRÀ I ROCAMORA. *L'apotecari de Camprodon. La nissaga dels Cuatrecasas*. Barcelona: Editorial Mediterrània, 2006).

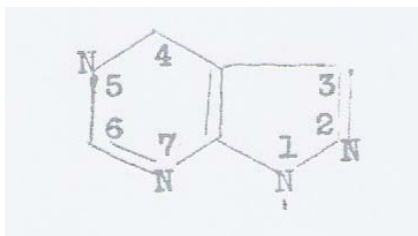
⁶² AHOEPM, patente 229.154; consta la memoria descriptiva de tres páginas foliadas y escritas a máquina por una sola cara, están firmadas en Madrid, a 11 de junio de 1956; como domicilio social de la entidad figura el número 304 de la calle Valencia, en Barcelona. La patente, en su modalidad de invención, fue aprobada el 7-VII-1956 y hecha pública el 1-X-1956.

fórmula general $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{N}-(\text{R}^1\text{R}^2)$, donde R^1 y R^2 son hidrógenos o radicales arílicos, alquílicos o aril-alquílicos. El procedimiento de obtención consiste en hacer reaccionar una sulfamida de fórmula general $\text{X}-\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2-\text{NH}_2$ [donde X representa un grupo amino, o cualquier radical susceptible de ser transformado en tal] con compuestos del tipo $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{N}-(\text{R}^1\text{R}^2)$ [representando R^1 y R^2 hidrógenos o radicales arílicos, alquílicos o aril-alquílicos], según la siguiente ecuación química:



También es posible emplear sales de urea o ureas sustituidas, pero en este caso es necesaria la adición de un carbonato⁶³.

Con fecha 13 de noviembre de 1958, la empresa suiza *Ciba Société Anonyme* presentó, ante el registro español, una patente de invención, por veinte años, destinada a proteger un “Procedimiento para la obtención de nuevas sulfamidas”⁶⁴. El objeto de esta invención es un procedimiento para obtener pirazolo-[3,4-d]-pirimidinas, sustituidas en un átomo de carbono por el resto para-amino-benzol-sulfamídico, en el núcleo de la fórmula indicada bajo estas líneas, y de sus sales, tanto de los metales alcalinos como de alcalino-térreos



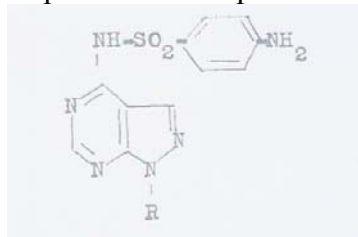
Es posible que los nuevos compuestos estén posteriormente sustituidos en el núcleo pirazolo-pirimidínico por restos arílicos, con preferencia en las posiciones 1 ó 2, por ejemplo restos naftílicos o fenólicos que, a su vez, pueden tener sustituyentes, tales como átomos de halógeno, grupos alquílicos, alcoxi, nitro o amínico; o por restos heterocíclicos, aralifáticos, cicloalifáticos o alifáticos⁶⁵.

⁶³ El autor ilustra su propuesta con dos ejemplos: 24 partes de p-acetil-amino-benceno-sulfamida se calientan en 609 partes de urea a 130°-140°C, hasta el cese de desprendimiento de amoníaco; se deja enfriar y se disuelve en 1.000 partes de sosa cáustica al 15%; se hierve durante tres horas, se trata con carbón, se filtra y acidifica con ácido acético hasta pH 6; el resultado es la precipitación de p-amino-benceno-sulfanilil-urea. En el segundo caso emplea 214 partes de p-acetilamino-benceno-sulfamida que se funden en 152 partes de nitrato de etil-urea y 106 partes de carbonato sódico anhidro; la temperatura se mantiene entre 150°-160° C hasta el desprendimiento de amoníaco; se deja enfriar, se disuelve el resultado en 1.000 partes de sosa cáustica al 15%, se trata con carbón, se filtra y acidifica con ácido acético hasta un pH comprendido entre 5,5 y 6; el precipitado obtenido es N-(p-amino-benceno-sulfanilil)-N-etil-urea.

⁶⁴ AHOEPM patente 245.281; la memoria descriptiva consta de 37 hojas mecanografiadas, numeradas y escritas por una sola cara; como domicilio empresarial figura sólo la ciudad de Basilea (Suiza). La memoria fue presentada el 13 de noviembre de 1958, en Madrid, y la patente concedida el 10 de marzo de 1959.

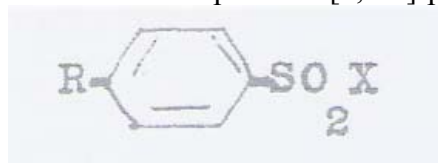
⁶⁵ Otros sustituyentes en otras posiciones del núcleo pirazolo-pirimidínico pueden ser restos alquílicos tales como metilo, átomos de halógenos, grupos mercapto o grupos amino terciarios tales como grupos dialquilo-amínico, alquilenamínico, oxa- o aza-alquilenamínico.

El procedimiento permite obtener compuestos de la fórmula indicada

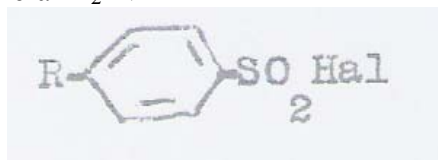


R puede corresponder a un hidrógeno, un fenilo cicloalquilo o, preferentemente, un resto alquilo bajo; además de sus sales.

El método consiste en que compuestos cuya fórmula general está indicada bajo estas líneas, se hacen reaccionar con compuestos de fórmula Y-R', donde X e Y, a excepción de un grupo amino contenido en uno de ellos, corresponden a -NH-, restos disociables durante la reacción; R es un grupo amino o un sustituyente que puede transformarse en él y R' es un resto de una pirazolo-[3,4-d]-piridina.



En la forma usual de obtención de las nuevas sulfamidas, se hace reaccionar compuestos de fórmula general indicada más abajo, donde Hal alude a un halógeno, con compuestos de fórmula general H₂-N-R'



Las reacciones se efectúan especialmente en presencia de agentes de disociación y agentes de condensación⁶⁶. También es posible obtener los compuestos de este tipo haciendo reaccionar sulfamidas con un halogenuro de fórmula Hal-R', en presencia de agentes de condensación básicos que puedan formar sales con la sulfamida⁶⁷.

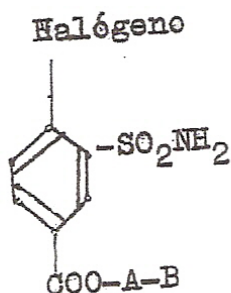
Los nuevos compuestos son útiles como medicamentos contra infecciones producidas por estreptococos; los autores señalan la importancia especial de 1-isopropilo-4-(p-amino-benzol-sulfamida)-pirazolo-[3,4-d]-pirimidina y sus sales, la cual muestra efecto terapéutico reconocido en ratones infectados con estafilococos. Para la preparación del medicamento deben elegirse, como vehículo, materiales que no reaccionen con el nuevo compuesto, como por ejemplo agua, gelatina, lactosa, almidón, ácido salicílico coloidal, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales u otros vehículos similares. Los preparados contendrán las nuevas sulfamidas, o sus sales, en

⁶⁶ Un sustituyente transformable en el grupo amino es aquel que, por hidrólisis (por ejemplo, grupo acetil-amínico), por reducción (por ejemplo, grupo nitro) o por tratamiento con amoníaco (por ejemplo, halógeno), se puede transformar en un grupo amínico.

⁶⁷ Las 3-amino-pirazolo-[3,4-d]-pirimidinas se pueden obtener haciendo reaccionar las 4-halógeno-5-ciano-pirimidinas con hidracinas. Las 4-amino u oxi-pirazolo-[3,4-d]-pirimidinas sustituidas se obtienen por reacción de ácidos alfa-ciano-beta-oxo-propiónicos, o sus derivados, ácidos y/u oxo funcionales, con hidracinas N-mono sustituidas que, en el átomo de nitrógeno N', tienen un resto disociable por hidrólisis, cierre del anillo del 3-amino-pirazol 1-sustituido que, en posición 4, lleva un grupo carboxílico libre o funcionalmente modificado y condensación con ácidos carbónicos o sus derivados, estando presente, por lo menos, uno de los ácidos en forma de derivado funcional que contiene grupos amino.

cantidades de más de 0,1 g. por unidad de dosificación; los autores recomiendan que ésta esté comprendida entre 0,25-3,0 g.⁶⁸

La empresa suiza *Sandoz A.G.* presentó, en el registro de patentes español, con fecha de 16 de mayo de 1961, una patente de invención al objeto de proteger un "Procedimiento de obtención de nuevas sulfamidas"⁶⁹; se trata de sulfamidas de fórmula general como la indicada bajo estas líneas, en la que sus sales ácidas de adición y composiciones farmacéuticas contienen, además de un soporte inerte, un compuesto de yodo y/o una sal ácida de adición del mismo. Los autores mantienen que este tipo de productos tienen efecto diurético.



Compuesto tipo I.

A. grupo metileno o etileno.

B. grupo nitrógeno, oxígeno o heterocíclico que contenga azufre, con uno de sus átomos de carbono enlazado al radical A.

De acuerdo con los autores de esta memoria, el procedimiento objeto de la patente proporciona un método para la obtención de los compuestos del tipo I y sus sales ácidas de adición, caracterizado por hacer reaccionar un compuesto de la fórmula general HO-A-B [en la que A y B tienen el significado asignado junto a la fórmula], con cloruro de 3-sulfamil-4-halógeno-benzoilo; cuando se precisa una sal ácida de adición, se realiza la salificación con un ácido orgánico o inorgánico⁷⁰.

Un método de aplicación del procedimiento es el siguiente: una suspensión de cloruro de 3-sulfamil-4-clorobenzoilo se mezcla con un compuesto I hasta que se haya realizado la disolución completa; el exceso del compuesto I se elimina por evaporación

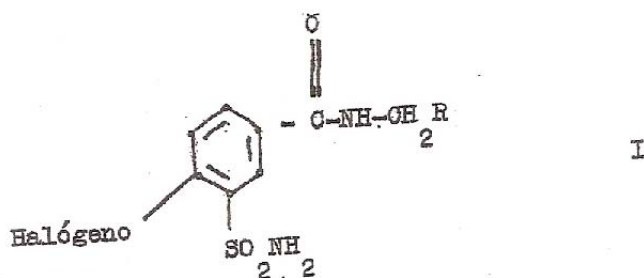
⁶⁸ La memoria se ilustra con una serie de ejemplos prácticos, de los cuales solamente indicamos el primero: una solución de 17,8 g. de 1-isopropilo-4-amino-pirazolo-[3,4-d]-pirimidina en 80 cm³ de piridina se mezcla con 30 g. de cloruro del ácido p-amino-benzo-sulfónico; se produce una reacción exotérmica; terminada ésta se calienta, durante una hora, a 95° C; la solución de reacción se vierte sobre 500 cm³ de ácido clorhídrico 2 N y algo de hielo. Se produce una precipitación, que se filtra al vacío. El producto bruto obtenido se mezcla con 500 cm³ de sosa cáustica 2,5 N; la suspensión obtenida se hierve durante dos horas y se mezcla con carbón animal; luego se realiza una nueva filtración. El filtrado obtenido se trata con ácido clorhídrico, a un valor de pH de 5-6; se obtiene un precipitado cristalino que se filtra en vacío y se vuelve a cristalizar con alcohol. El producto obtenido es la 1-isopropilo-4-(p-amino-benzol-sulfamida)-pirazol-[3,4-d]-pirimidina, en forma de cristales blancos, de punto de fusión 249°-250° C.

⁶⁹ AHOEPM, patente 267.411; la memoria técnica consta de doce páginas, escritas a máquina por una sola cara; queda firmada, en Madrid, el 16 de mayo de 1961; como domicilio social de la empresa se hace constar Basilea (Suiza). La patente española fue concedida el 25-IX-1961 y publicada el 16-XI-1961.

⁷⁰ Los siguientes ácidos son ejemplos adecuados para salificar los compuestos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, cítrico, oxálico, tartárico, succínico, maléico, acético, benzoico, hexahidrobenczoico, metasulfónico, fumárico, gálico e iodhídrico.

en vacío; el residuo oleaginoso resultante, mediante frotamiento, cristaliza el éster correspondiente, que luego se purifica por los métodos conocidos⁷¹.

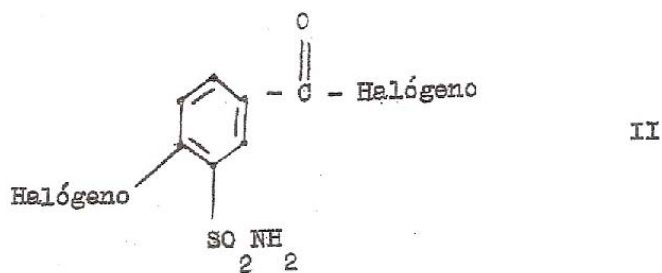
Complementario a éste es el expediente de registro de patente de invención, presentado por esta misma empresa, *Sandoz A.G.*, unos meses después, con fecha de 21 de diciembre de 1961, destinado a proteger un "Procedimiento de obtención de nuevas sulfamidas"⁷²; el método proporciona compuestos de fórmula general I y composiciones farmacéuticas que contienen, además de un soporte inerte, un compuesto tipo I.



Compuesto I.

R representa un radical furilo o tetrahydrofurilo.

Este procedimiento está caracterizado por hacer reaccionar un compuesto de fórmula general II con una amina del tipo $R-CH_2-NH_2$; en el proceso indicado es aconsejable la presencia de un agente capaz de absorber el haluro de hidrógeno, por ejemplo una base terciaria.



Compuesto de fórmula general II.

Este procedimiento se aplica del modo siguiente: se añade un compuesto de fórmula general II (*vide supra*) a una solución refrigerada de una amina del tipo $R-CH_2-NH_2$ en cloroformo que contenga trietilamina, y se agita durante algunas horas a la temperatura ambiente; el disolvente se elimina luego por destilación y el residuo se recoge en acetato de etilo y se lava con agua; después de secarlo sobre sulfato magnésico, se evapora el acetato de etilo a presión reducida y el compuesto resultante [compuesto I] se purifica por los métodos ya conocidos⁷³.

⁷¹ En la memoria técnica se exponen algunos ejemplos, entre otros la obtención del éster tetrahydrofurfurílico del ácido 3-sulfamil-4-cloro-benzoico y del éster tetrahydropiranil-(2')-metílico del ácido 3-sulfamil-4-cloro-benzoico.

⁷² AHOEPM, patente 273.136; la memoria descriptiva consta de siete hojas mecanografiadas por una sola cara, firmadas en Madrid, a 21 de diciembre de 1961. La patente española fue concedida el 17-V-1962 y publicada el 1-VII-1962.

⁷³ En la memoria se proponen ejemplos aclaratorios para la obtención de tetrahydro-furfuril-amida del ácido 3-sulfamil-4-cloro-benzoico y de furfuril-amida del ácido 3-sulfamil-4-cloro-benzoico.

1.2.3. Derivados halogenados de sulfamidas

El 17 de abril de 1942 Jacinto Megías Fernández⁷⁴, a la sazón director del *Instituto Llorente*, presenta en registro un procedimiento de obtención de derivados de sulfamidas⁷⁵, su procedimiento está dedicado a la obtención de derivados dibromados en el núcleo de la sulfamida, que tienen como fórmula general: $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_2-\text{Br}_2\text{SO}_2\text{N}-(\text{RR}')$, donde R y R' son hidrógenos u otros radicales cualesquiera. El propio autor da cuenta de su utilidad: “Habiéndose preconizado el uso de las Sulfamidas derivados como antisépticos de uso externo....”; la memoria, sumamente escueta, apenas permite conocer su fundamento científico.

El autor, partiendo del hecho de que los derivados de las sulfamidas pueden ser usados como antisépticos de uso externo, y que también se pueden emplear con el mismo fin algunos derivados del benceno bromados en el núcleo, pensó en la posibilidad de que derivados di-bromados de las sulfamidas pudieran tener utilidad terapéutica. Sus indicaciones son muy concisas y en ellas no se especifica la forma concreta de aplicación de los productos y, mucho menos, las posibles formas galénicas.

En el momento en que se presenta la patente a registro ya se había recomendado el uso de las sulfamidas como antisépticos de uso tópico, habiéndose utilizado para ello diversos derivados del benceno bromados en el núcleo. El solicitante de esta patente propone la obtención de estas sustancias empleando métodos que permitan determinar, de forma cuantitativa, estas sustancias⁷⁶. De algún modo, su patente puede considerarse precursora de la que, más tarde, desarrollaría Ramón de Montaner al obtener diversos derivados yodados de las sulfamidas.

⁷⁴ Jacinto Megías y Fernández (Las Palmas, 1888 / Madrid, 1956), realizó estudios de Medicina, en los que obtuvo el título de doctor (1917); se especializó en técnicas bacteriológicas, trabajo en el *Instituto Microbiológico de Madrid (Instituto Llorente)*, centro que dirigió desde 1916; en 1919, con ocasión de los actos del Centenario de Jenner en la Academia de Medicina de París, representó al Estado español. En 1944 aún trabajaba para el *Instituto Llorente*; presidió el Consejo de Administración de la Compañía *Antibióticos S.A.*, al menos en 1950 (*ABC*, 16-XI-1950: 3). Fue médico de la Real Casa (1916); estuvo en posesión de la Gran Cruz de Beneficencia con distintivo blanco y morado (1921) y la Gran Placa de Honor y Mérito de la Cruz Roja (1923); desde 1951 (21-II) fue académico de número de la Real Academia Nacional de Medicina, ocupó la medalla 34; su discurso de ingreso, relativo a *Los fundamentos de la inmunización activa contra la difteria*, fue contestado por Gregorio Marañón (cf. José Manuel RAMÍREZ JEREZ (comp.). *Académicos numerarios del Instituto de España (1938-2004)*. Madrid: Instituto de España, 2005).

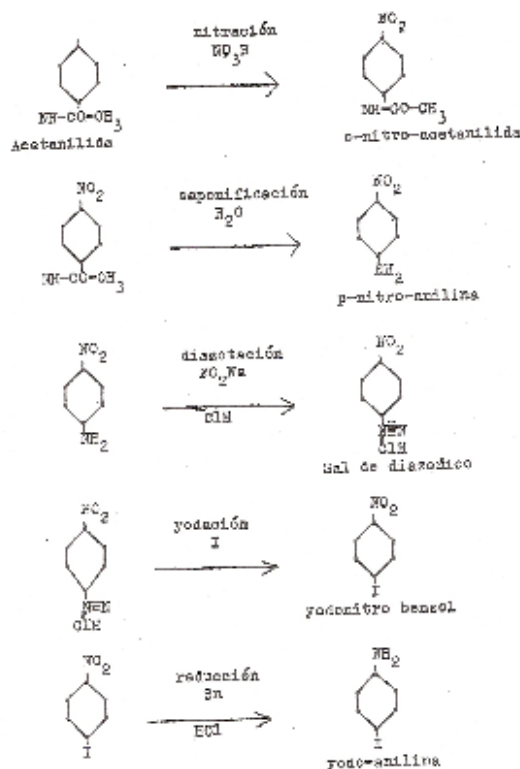
⁷⁵ AHOEPM, patente 156.752; su memoria descriptiva está fechada el 1 de abril de 1942, contiene sólo tres folios; como domicilio social hace figurar Madrid. Esta patente, de invención, fue concedida el 9-II-1943 y hecha pública el 1-IV-1943.

⁷⁶ El autor propone, como ejemplo, la preparación de dibromo-sulfanil-amida: una molécula [*sic* por mol?] de para-amino-sulfamida es disuelta en agua clorhídrica; sobre esta disolución se adicionan cuatro átomos [*sic*] de bromo por medio de una disolución acuosa de bromuro sódico, o de otra disolución ácida formada por una mezcla de bromuro y bromato. Se separa un cuerpo blanco, que funde a 245° C y se purifica por cristalización.

Su propuesta presenta algunas dificultades: el bromo procedente de los compuestos bromados también reaccionará con el grupo amino, con lo que la reacción que propone el inventor no es tan sencilla; por otra parte, habría que pensar en qué posiciones del núcleo de benceno se producen las sustituciones de los bromos y, en tercer lugar, el bromo procedente del bromuro y el procedente del bromato, puede ser que reaccionen con diferente intensidad.

El 12 de marzo de 1943 Ramón de Montaner Giraudier⁷⁷ comenzó a tramitar una serie de patentes relativas a sulfamidas yodadas. Su primer registro tenía como objeto proteger un “Procedimiento para la obtención de nuevos productos derivados de las sulfamidas”⁷⁸. El procedimiento consiste, esencialmente, en combinar la para-amino-fenilo-sulfamida, su cloruro o su derivado acetilado, con derivados yodados que tengan un grupo amino o fenol⁷⁹; gracias a esta asociación se obtiene la sustitución de un hidrógeno del grupo sulfamídico, o los hidrógenos del grupo amino, por un radical yodado, con lo cual se incorpora yodo al grupo sulfamídico, combinándose ventajosamente las propiedades de ambos.

Los derivados yodados pueden obtenerse por cualquiera de los procedimientos conocidos; en la memoria se cita, como ejemplo, el proceso de yodación, partiendo de la acetanilida e introduciendo yodo por diazotación.



Con este proceso se obtiene yodo-anilina, la cual se incorpora a un grupo sulfamídico empleando, preferentemente, para-acetil-amino-sulfocloruro⁸⁰; de acuerdo

⁷⁷ No disponemos de datos que permitan vincular a Ramón de Montaner Giraudier con ningún laboratorio farmacéutico hispano.

⁷⁸ AHOEPM, patente 161.055; su memoria descriptiva consta de cinco páginas, escritas por una cara, firmada en Barcelona el 12 de marzo de 1943; como domicilio social sólo consta Barcelona. La patente fue concedida con fecha de 19-V-1943 y publicada el 1-IX-1943.

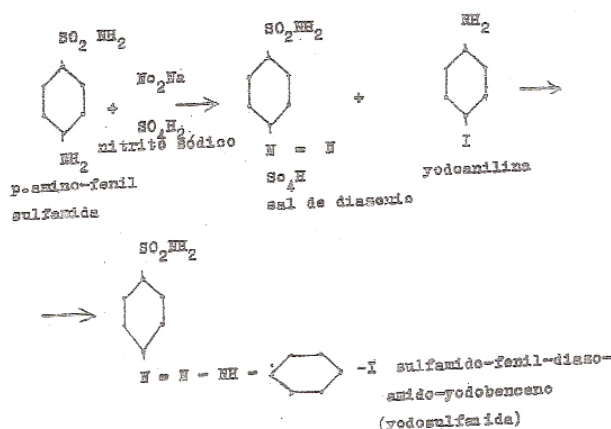
⁷⁹ Se pueden emplear, con ventaja, aquellos derivados yodados que proceden de la introducción de uno o varios átomos de yodo en una cadena abierta (serie alifática), o bien de la introducción del yodo en un grupo bencénico, naftalénico, piridínico, pirimidínico, tiazólico u otros análogos.

⁸⁰ En la memoria se procede de la siguiente manera: partes iguales de para-acetil-amino-sulfocloruro y de yodo-anilina, previamente disueltas en disolvente apropiado, se calientan a reflujo, formándose en esta reacción acetil-amino-fenil-sulfamido-yodo-benceno; este producto se hierve con ácido clorhídrico diluido y, después de neutralización con sosa, se separa para-amino-fenil-sulfamido-

con el autor de la memoria, estos compuestos tienen propiedades terapéuticas notables y son perfectamente tolerables por el organismo.

Poco tiempo después, el 22 de enero de 1944, Ramón Montaner Giraudier presentó un certificado de adición a la patente que acabamos de comentar, con el título de “Mejoras en el procedimiento de obtención de nuevos productos derivados de las sulfamidas, objeto de la patente principal número 161.055”⁸¹; el propio autor señala que, para llevar a cabo el procedimiento que se describe en la patente principal, el núcleo sulfamídico puede presentar distintas formas aptas para el procedimiento a seguir, siendo la principal la forma de la sulfamida (esto es, la para-amino-fenil-sulfamida) y la forma de un benceno-sulfo-cloruro. Sin embargo, tras nuevas etapas experimentales, según apunta el propio autor, se ha encontrado que, además del sulfo-cloruro, puede emplearse también cualquier derivado halogenado (en general, los benceno-sulfo-halogenuros) que tengan en posición ‘para’ un sustitutivo transformable en grupo amino, con lo cual se desarrollan variantes en los procesos químicos a seguir, que se explicitan en este expediente complementario. Constituye la novedad esencial de este certificado la combinación de un núcleo sulfamídico con yodo o con un compuesto yodado, dando lugar a una serie de compuestos nuevos, que el autor describe por medios de ejemplos:

EJEMPLO I.

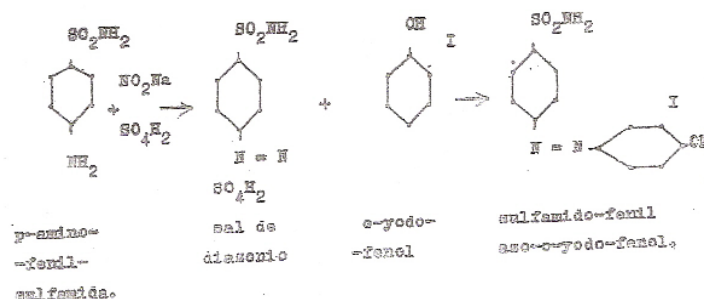


En el ejemplo I, el enlace es verificado a través del grupo amino en posición ‘para’ con el grupo sulfamídico; se trata para-amino-fenil-sulfamida con ácido sulfúrico y se diazota con nitrito sódico; se disuelve, por otra parte, para-yodo-fenil-sulfamina con ácido acético y se vierte esta solución sobre la sal de diazonio, precipitándose la sulfamido-fenil-diazo-amino-yodo-benceno.

yodo-benceno. Procediendo de esta forma se obtienen una serie de nuevos compuestos basados en la incorporación de derivados yodados al grupo sulfamídico y, entre ellos, su sal sódica, obtenida por la introducción del sulfonato sódico en la molécula del compuesto citado.

⁸¹ AHOEPM, patente 164.635; esta memoria descriptiva consta de seis páginas, escritas por una sola cara, fechadas en Barcelona el 22 de enero de 1944; como domicilio social de la empresa solamente consta la ciudad de Barcelona. El certificado de adición fue aprobado el 13-II-1944 y hecho público unos días después, el 16-II-1944.

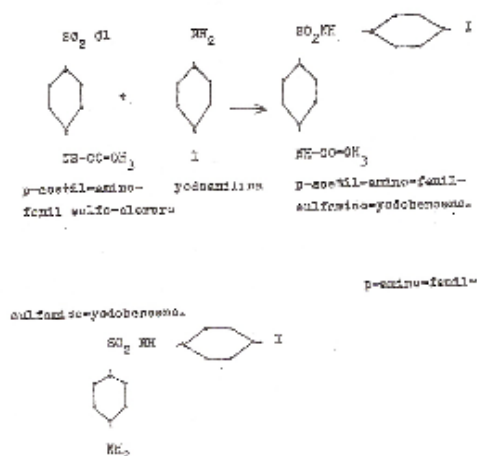
EJEMPLO II.



En el ejemplo II, por medio de un tratamiento similar al descrito en el ejemplo anterior, se consigue también el enlace entre el grupo amino, en posición 'para', con el grupo sulfamídico y un compuesto yodado con un grupo fenol, por ejemplo el orto-yodo-fenol, dando lugar a un nuevo compuesto que responde a la composición sulfamido-fenil-azo-orto-yodo-fenol.

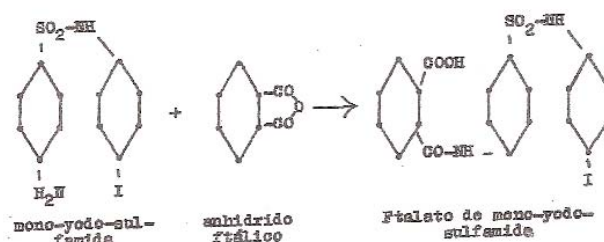
En el ejemplo III se parte de un benceno-sulfo-halogenuro; se disuelven partes iguales de para-acetil-amino-fenil-sulfocloruro y de para-yodo-anilina en disolvente apropiado, se mezclan y calientan; como resultado de esta reacción se forma para-acetil-amino-fenil-sulfamido-yodo-benceno, que se separa por diazotación. Este producto se saponifica, por ebullición, con ácido clorhídrico diluido; el compuesto resultante se neutraliza con sosa, separándose para-amino-sulfamido-yodo-benceno.

EJEMPLO III.



Bastantes años más tarde, el 25 de abril de 1950, Ramón Montaner Giraudier volvió a presentar, en el registro español de patentes, un nuevo expediente relacionado con los derivados yodados de las sulfamidas, lleva el título de “Procedimiento para la obtención de derivados ftálicos de la mono-yodo-benceno-sulfamida”⁸². En sus anteriores métodos de síntesis Ramón Montaner explicó la obtención de para-amino-fenil-sulfamido-yodo-benceno, caracterizado por la combinación de para-amino-fenil-sulfamida con un derivado yodado que contiene un grupo amino o fenol, tal como la yodo-anilina, lo cual da lugar a la obtención de derivados mono-yodados del grupo del sulfamídico; en esta ocasión presenta un procedimiento para obtener, a partir del producto antes señalado, un nuevo compuesto con otras aplicaciones terapéuticas.

El procedimiento objeto de esta patente consiste en someter la mono-yodo-sulfamida en su forma amino, en solución ácida obtenida por medio de un ácido orgánico, a un tratamiento con un ligero exceso de anhídrido ftálico, también en solución homóloga; ambas soluciones se mezclan y calientan a reflujo durante el tiempo necesario para llevar a término la reacción completa. El producto de la reacción forma una suspensión en la solución; se escurre y lava con agua fría hasta quitarle todas las materias extrañas; a continuación se deseca cuidadosamente para evitar su descomposición; se obtiene el derivado ftálico de la para-amino-fenil-sulfamido-yodo-benceno.



El producto obtenido tiene muy baja absorción por los tejidos y, por tanto, al circular por el aparato digestivo su concentración apenas disminuye, circunstancia que lo hace muy activo frente a gérmenes intestinales, principalmente de tipo coco y coli; por lo que puede constituir un medicamento indicado contra estos protozoarios; la acción conjunta de yodo y sulfamida le confieren efectos altamente eficaces, en opinión del autor de la patente.

1.2.4. Derivados tiazólicos de sulfamidas

Aun cuando el 1,2,5-tiodiazol es isómero del 1,3,4-tiodiazol, los compuestos de ambos grupos tienen propiedades bien diferentes, sendas patentes presentadas ante el registro español aluden a estos productos.

⁸² AHOEPM, patente 192.849; la memoria descriptiva consta de cuatro páginas, escritas por una sola cara, fue firmada en Barcelona el 25 de abril de 1950; como domicilio social figura el número 224-B de la calle Provenza, en Barcelona. Esta patente, de invención, fue concedida el 24-I-1951 y hecha pública el 16-II-1951.

El 5 de enero de 1946 la empresa norteamericana *Hoffmann-La Roche* presentó un expediente de reconocimiento de una patente de invención destinada a proteger “Un procedimiento de preparar derivados de sulfamida solubles en agua”⁸³; la patente se refiere a nuevos derivados de sulfamida que se caracterizan por la presencia de un anillo heterocíclico, en posición N¹, en la molécula de sulfamida, y de un resto acíclico alifático sustituido por un grupo de nitrógeno cuaternario en posición N⁴, y que se representa por la fórmula general (R,R')CH-CO-N⁴H-C₆H₄-SO₂-N¹H-R'', donde R representa un hidrógeno o alcoholilo, R' un radical de nitrógeno cuaternario y R'' un anillo heterocíclico.

Estas combinaciones forman un nuevo grupo de productos con utilidad como antisépticos intestinales; son muy solubles en agua y, a pesar de su solubilidad, sólo son absorbidas -muy lenta e incompletamente- en el tubo intestinal, por lo que se observan niveles muy bajos en sangre tras su administración por vía oral⁸⁴.

Los materiales de partida empleados para la preparación de estas nuevas combinaciones son los derivados N⁴-halógeno-acíclicos de sulfa-combinaciones que contienen, en posición N¹ de la molécula de sulfanil-amida, un anillo heterocíclico del tipo de 2-N⁴-cloro-acetil-sulfanil-amido-pirimidina, 2-N⁴-alfa-cloro-propionil-sulfanil-amido-pirimidina, 2-N⁴-alfa-bromo-propionil-sulfanil-amido-pirimidina, 2-N⁴-cloro-acetil-sulfanil-amido-tiazol, 2-N⁴-bromo-propionil-sulfanil-amido-tiazol, 2-N⁴-cloro-acetil-sulfanil-amido-pirimidina y combinaciones similares. En lugar de derivados N-halógeno-acíclicos de sulfa-combinaciones, pueden también emplearse sulfitos, sulfatos, alcohol-sulfonatos o aril-sulfonatos de reacción similar, de los correspondientes derivados N⁴-hidroxi-acíclicos.

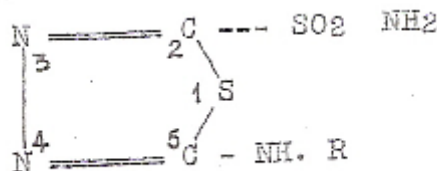
Cuando estos materiales de partida se hacen reaccionar con aminas terciarias, por ejemplo con piridina o trimetilamina, se obtiene -con buenos rendimientos- los nuevos derivados de sulfanil-amida solubles en agua, que tienen como fórmula general la arriba indicada. Las reacciones pueden realizarse en frío o a temperaturas elevadas y usando o no un disolvente o diluyente; si se emplea una mezcla de reacción acuosa, en lugar de obtener directamente las sales solubles en agua de los nuevos derivados de nitrógeno cuaternario, se logran como productos intermedios las correspondiente bases libres o sus anhídridos intramoleculares, que pueden convertirse fácilmente en las correspondientes sales solubles por tratamiento con un ácido; así por ejemplo, calentando una suspensión de 2-N⁴-alfa-cloro-propionil-sulfanil-amido-pirimidina en piridina seca, se forma 2-N-[N⁴-alfa-piridinio-propionil]-sulfanil-amido-pirimidina; esta combinación tiene una toxicidad muy baja, la dosis tolerada en ratones es más de 15 g./kg. cuando se administra por vía oral, y más de 10 g./kg. si se administra subcutáneamente⁸⁵.

⁸³ AHOEPM, patente 172.048; la memoria descriptiva consta de diecinueve hojas, escritas por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 5 de enero de 1946; como domicilio social de la empresa figura Roche Park, Nutley (New Jersey, EE. UU.). La patente española, de invención, fue aprobada el 5-IX-1946 y publicada el 1-X-1946.

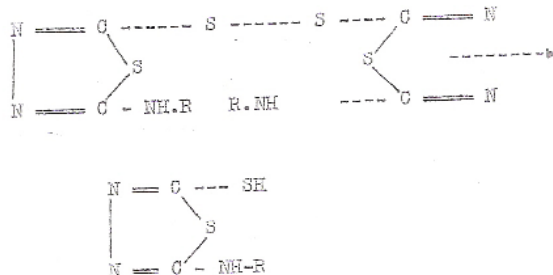
⁸⁴ Es esta propiedad muy deseable en las combinaciones que se han de usar como antisépticos intestinales ya que, a consecuencia de la absorción incompleta, se evita la aparición de complicaciones renales, tan frecuentes en los derivados de sulfamidas.

⁸⁵ La preparación de este nuevo derivado de sulfanilamida soluble, y de una serie de combinaciones análogas, queda descrita con detalle en la memoria descriptiva; entre los productos preparados se encuentran: cloruro de 2N⁴-[N-piridinio-acetil]-sulfanil-amido-tiazol, cloruro de 2-N⁴-[N-piridinio-acetil]-sulfanil-amido-piridina y cloruro de 2-N⁴-[N-piridinio-acetil]-sulfanil-amido-pirimidina.

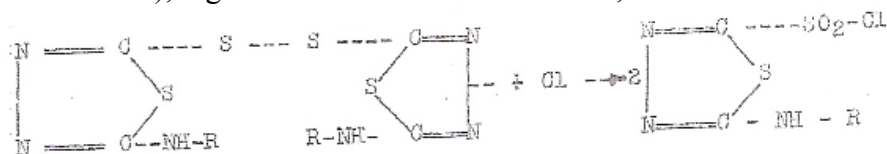
Con fecha 3 de junio de 1955, la empresa *Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A.* presentó en el registro de patentes una invención destinada a proteger “Un nuevo procedimiento para la obtención de sulfamidas”⁸⁶. El objeto de esta invención es un procedimiento para obtener sulfamidas sobre el núcleo heterocíclico del tipo



Ya en el verano de 1922, el químico Praphulla Chandra Guha, del *University College of Science* de Calcuta⁸⁷, describió el mecanismo mediante el que, tratando el disulfuro de di-R-amino-1,3,4-tiodiazol con hidrato sódico y su posterior acidificación, se originaba 5-R-amino-1,3,4-tiodiazol-2-tiol. La molécula final obtenida sirve, en general, para la preparación de 1,3,4-tiodiazol-2-sulfamidas.



La propuesta presentada por la empresa *Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A.* abrevia esta síntesis, partiendo del disulfuro de di-R-amino-1,3,4-tiodiazol-tiol y, mediante una sola operación de cloración (oxidación con corriente de cloro), logra directamente el sulfocloruro, tal como se indica:



El sulfocloruro, por tratamiento con amoníaco acuoso, se transforma en sulfamida.

Tras una escueta información teórica sobre el contenido de su invención, la memoria se complementa con un ejemplo de obtención de 5-acetil-amino-1,3,4-tió-diazol-2-sulfamida: comienza preparando el di-(acetil-amino-1,3,4-tiazol)-disulfuro mediante el tratamiento de 100 g. de di-(amino-1,3,4-tiodiazol)-disulfuro, con 2.000 g.

⁸⁶ AHOEPM, patente 222.209; la memoria descriptiva consta de cinco páginas foliadas, escritas por una sola cara; está firmada en Madrid, a 3 de junio de 1955; como domicilio social de la empresa figura avenida de San Antonio María Claret, número 173, de Barcelona. Esta patente de invención fue concedida el 25-X-1955 y publicada el 1-XII-1955.

⁸⁷ Cf. Praphulla Chandra GUHA. “Constitution of the so-called dithio-urazole of Martin Freund. I”. *Journal of the American Chemical Society*, 44(7): 1502-1510. Washington DC, 1922. El artículo está referenciado en la memoria que comentamos.

de ácido glacial y 100 g. de anhídrido acético, en un matraz con refrigerante de reflujo y agitador; calienta el reflujo durante 30 minutos, lo enfría y filtra y lava el residuo que, después de cristalizado, funde a 288° C con descomposición. Conseguido el di-acetil derivado, el autor pasa la obtención de 5-acetil-amino-1,3,4-tiodiazol-2-sulfo-cloruro; para ello dispone en un matraz, provisto de un potente agitador, 1.000 g. de di-(5-acetil-amino-1,3,4-tiodiazol)-disulfuro, en suspensión con 300 cc. de ácido acético al 50%, e introduce, a través de un capilar y de manera rápida, una corriente de cloro, a una temperatura entre 6°-8° C, durante 24 horas, agitando de manera rápida y enérgica; filtra el resultado y lo lava con agua helada, escurriendo al máximo; el producto cristalizado funde a 194° C, con descomposición. El disulfuro obtenido del tratamiento de 1.000 g. lo añade, poco a poco, sobre 3.500 g. de amoníaco acuoso, agita manteniendo la temperatura entre 8°-12° C mediante hielo; a medida que se va añadiendo disulfuro, se disuelve transformándose en sulfamida; filtra la solución obtenida, la neutraliza con ácido clorhídrico diluido hasta un pH 6,8; separa por filtración la sulfamida que ha precipitado, que escurre seca. El producto seco de agua es el 5-acetil-amino-1,3,4-tiodiazol-2-sulfamida; funde a 259° C, con descomposición.

1.2.5. Toluol-sulfamidas

Con fecha 2 de octubre de 1947, Coloma Giralt Domenech⁸⁸ presentó una patente de invención destinada a proteger “Un nuevo procedimiento para la fabricación del orto-toluol-sulfamida pura, necesaria en la obtención del ácido orto-sulfamido-benzoico”⁸⁹. Las reacciones químicas de los diversos productos que intervienen para la fabricación de la sacarina son factibles siguiendo el método genérico de su elaboración a partir de la primera reacción del tolueno con clorhidrina sulfúrica; en esta reacción se produce orto-tolueno-sulfo-cloruro; al hacer reaccionar con amoníaco este nuevo compuesto se produce su transformación amídica.

Todas las cuestiones relativas a la fabricación y obtención de un mejor rendimiento parten de la base obtenida, que viene ligada con una porción de isómeros e impurezas formadas -y arrastradas- desde la primera reacción; ello obliga al fabricante a purificar la sulfamida antes del tratamiento definitivo de su reacción de oxidación. Al objeto de evitar los inconvenientes apuntados, el nuevo procedimiento patentado consiste, esencialmente, en que la sulfamida del orto-tolueno se disuelve en agua amoniacal en caliente y se filtra el líquido obtenido; una vez enfriada la disolución, se neutraliza por medio de ácido clorhídrico o sulfúrico, que -de acuerdo con la autora- precipitará, en estado de su total pureza, la sulfamida tratada.

Pocos meses después, el 29 de enero de 1948, Rogelio Boix Güell⁹⁰ presentó a registro una patente de invención para proteger “Un nuevo procedimiento para la

⁸⁸ Esta misma autora, probablemente química de formación, presentó a registro, con fecha 10-IV-1947, una patente para proteger “Un procedimiento de una disolución de hexaclorobenceno”. No conocemos más datos sobre ella.

⁸⁹ AHOEPM, patente 179.972. La memoria descriptiva consta tan sólo de tres hojas mecanografiadas, numeradas y foliadas por una sola cara; el documento queda fechado en Madrid, a 2 de octubre de 1947; como domicilio de la autora figura Badalona (Barcelona). Esta patente, de invención, fue concedida el 3-X-1947 y publicada el 16-XI-1947.

⁹⁰ De este autor, quizás vinculado a la industria textil, tampoco poseemos datos biográficos; sí nos consta que presentó a registro otras patentes por estas mismas fechas: “Un nuevo procedimiento para

obtención de sulfamida benzoica”⁹¹. La obtención de la sulfamida benzoica por medio del método clásico de Heyden exige una instalación de maquinaria costosa; además, el procedimiento es peligroso, debido al empleo de productos corrosivos y a la cierta posibilidad de explosión, al ser atacado el toluol por el ácido cloro-sulfónico⁹²; además del constante riesgo al que están sometidas las personas encargadas de la fabricación de la sulfamida benzoica por el método aludido, sobre todo en la fabricación en gran escala, que han de operar en un ambiente viscoso y bajo el insoportable olor del toluol-sulfo-cloruro. De acuerdo con la propuesta del autor, con este método se evitan los inconvenientes indicados, a la par que permite disponer de materia prima abundante⁹³; su método se presenta, además, como limpio y sin necesidad de maquinaria costosa o especial, siendo la obtención de la sulfamida benzoica mucho más rápida⁹⁴.

La propuesta de Rogelio Boix Güell parte de orto-toluidina, ácido antranílico y derivados, con ellos obtiene los ácidos sulfinicos y, de éstos, por reacción con halógenos, haluros de fósforo, etc., los correspondientes sulfo-halogenuros bencénicos que, tratados con amoníaco (acuoso o seco) o carbonato amónico, proporcionan las sulfamidas.

La transformación del amino compuesto en el correspondiente ácido sulfinico puede tener lugar en solución acuosa, alcohólica (etanol) o en otro medio apropiado; a este fin se diazota el grupo -NH₂, el compuesto diazoico se satura con dióxido de azufre (o se mezcla con bisulfito sódico, para engendrarlo en la propia masa) y se descompone el producto de adición obtenido añadiendo un catalizador apropiado, especialmente cobre metálico o un compuesto cuproso o cúprico cualquiera⁹⁵. Algunos ácidos sulfinicos son poco estables en estado libre, sobre todo en presencia de ácidos fuertemente inorgánicos; en este caso es preferible neutralizarlos a medida que se forman. El ácido sulfinico libre, o sus sales alcalinas, se someten a la acción del cloro, bromo, pentacloruro de fósforo, hipocloritos, hipobromitos o, en general, de un agente

la obtención de celulosa”, el 31-III-1948 (AHOEPM, patente 183.262) y, justo un año después, el 31-III-1949, otro de igual título: “Un nuevo procedimiento para la obtención de celulosa” (AHOEPM, patente 187.648).

⁹¹ AHOEPM, patente 182.320. La memoria descriptiva está conformada por once páginas foliadas y mecanografiadas por una sola cara; está firmada en Barcelona, el 29 de enero de 1948; como domicilio del autor figura el número 86, 3º de la calle Barcelona, en Manresa (Barcelona). La patente, de invención, fue concedida el 13-II-1948 y hecha pública el 1-IV-1948.

⁹² Las materias básicas empleadas en el método de Heyden son toluol y anhídrido sulfúrico (del que deriva el ácido clorosulfónico), utilizadas igualmente en la fabricación de explosivos, razón por la que el Ejército las necesitaba en grandes cantidades.

⁹³ Por ejemplo ácido antranílico, que se obtiene a bajos precios por la vía: naftalina a anhídrido ftálico y a ácido antranílico.

⁹⁴ De acuerdo con el autor, el tiempo necesario para la obtención de 1 kg. de sulfamida, por este procedimiento, es veinte veces menor que el empleado por el método de Heyden, no necesitando los cuidados especiales que requiere la oxidación de la toluol-sulfamida y sin necesidad de purificar el ácido, operación engorrosa que presenta el método clásico.

⁹⁵ El aislamiento del ácido sulfinico es siempre un proceso delicado que debe variar en cada caso de acuerdo con la mayor o menor solubilidad del compuesto y del disolvente empleado; cuando el ácido sulfinico es difícilmente soluble se precipita simplemente, de sus disoluciones alcalinas, por adición de un ácido mineral; cuando el ácido sulfinico es bastante soluble lo mejor es extraerlo con éter o un disolvente análogo, o precipitarlo en medio ácido con sales de metales pesados, por ejemplo sales férricas, cobálticas, etc., con excepción de las sales ferrosas, de cromo y aluminio; el sulfonato metálico así obtenido se descompone con un álcali. De acuerdo con la propuesta del autor, también da buenos resultados efectuar el salado con cloruro sódico.

halogenante, con lo cual se obtiene el sulfocloruro o sulfobromuro que, a su vez, se transforma en sulfamida benzoica por medio del amoníaco; en realidad se forma una sulfamida lábil, que espontáneamente se convierte en sulfamida benzoica.

El autor propone, también, la posibilidad de obtener sulfamida benzoica en una sola operación: disolviendo los ácidos sulfanílicos en amoníaco y haciendo entonces actuar el halógeno -o el agente halogenante- sobre la mezcla⁹⁶; incluso puede obtenerse la sulfamida benzoica directamente de las aminas correspondientes, es decir sin aislar los compuestos intermedios: los ácidos sulfanílicos y los haluros de ácido sulfónico⁹⁷.

1.2.6. Colorantes azoicos

A fines de 1960, con fecha de 21 de diciembre, será la empresa belga *Société Carbochimique S.A.*, quien presentará una solicitud de patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento de preparación de nuevos colorantes sulfamidados”⁹⁸. El procedimiento tiene por objeto la preparación de colorantes monoazoicos sulfamidados, así como de sus complejos de cromo y de cobalto, abarcando igualmente las fibras polipeptídicas, naturales y sintéticas, tratadas por medio de los referidos colorantes.

Los colorantes monoazoicos encierran una o dos funciones sulfamídicas, en las que, una por lo menos, es una función sulfamídica terciaria que corresponde a la fórmula $-\text{SO}_2\text{N}[\text{alquilo}]-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CN}$ ⁹⁹. Los compuestos portadores de la función sulfamídica anteriormente definida pueden prepararse, de acuerdo con la memoria descriptiva, poniendo en reacción un sulfocloruro, una mono-alquil-amina y acrilonitrilo; el orden en que estas operaciones se ejecutan puede variarse¹⁰⁰. Los colorantes metalíferos obtenidos por este procedimiento encierran un átomo de cromo o de cobalto asociados a dos moléculas de azoicos, que pueden ser idénticas o diferentes, pero en las que una, por lo menos, corresponde a la definición anteriormente indicada.

La razón del registro de este procedimiento es su utilidad como colorante textil; los productos obtenidos son tintes metalíferos que tiñen fibras polipeptídicas naturales tales como lana, seda y cuero, así como fibras sintéticas del tipo del *nylon*, *perlon* y *rilsan*, en medios neutros o débilmente ácidos; gracias a la función sulfamídica terciaria

⁹⁶ El uso de hidroxilamina en lugar de amoníaco permite prescindir, en algunos casos, de la fase de sulfohalogenuro, obteniéndose la sulfamina benzoica directamente de los ácidos sulfínicos.

⁹⁷ El autor termina su memoria descriptiva con unos ejemplos aclaratorios en los que explica la obtención de sulfamida benzoica partiendo de diferentes materias primas: orto-toluidina, éster metílico, ácido orto-amino-benzoico y ácido antranílico.

⁹⁸ AHOEPM, patente 263.469; la memoria descriptiva consta de nueve hojas, escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, a 21 de diciembre de 1960; como domicilio social de la empresa consta 29 rue de Naples, Bruselas (Bélgica). La patente española fue aprobada el 3-I-1961 y hecha pública el 1-III-1961.

⁹⁹ Estos colorantes mono-azoicos llevan, sobre cada uno de los átomos de carbono, en posición ‘orto’ con relación al grupo azoico, un grupo metalizable tal como los grupos hidroxilo, carboxilo o aminado, o un grupo susceptible de transformarse en grupo metalizable, como un grupo alcoxilo o un átomo de halógeno.

¹⁰⁰ Se puede hacer reaccionar el acrilonitrilo con una mono-alquil-amina y la alquil-(beta-cianoetil)-amina obtenida, $\text{NH}[\text{alquilo}]-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CN}$, con un sulfocloruro; o condensar un sulfocloruro con mono-alquil-amina, y la mono-alquil-sulfamida obtenida, ya sea inmediatamente después o en una fase ulterior, con acrilonitrilo. Los autores señalan que esta última condensación puede efectuarse de un modo particularmente fácil, y con rendimientos excelentes, en agua, en presencia de sosa cáustica o de piridina, de preferencia a una temperatura superior a 35° C.

-SO₂N-[alquilo]-C₂H₄-CN, poseen una elevada afinidad por las fibras y, al mismo tiempo, la naturaleza hidrófila deseada para el teñido¹⁰¹. En la memoria se proponen varios ejemplos aclaratorios de este procedimiento¹⁰².

Este mismo día, el 21 de diciembre de 1960, la *Société Carbochimique S.A.* presentó un expediente de patente, complementario del anterior, sobre un “Procedimiento para la preparación de nuevos colorantes sulfamidados”¹⁰³; concretamente, la nueva patente tiene por objeto un procedimiento de preparación de colorantes azoicos sulfamidados de cobalto y de cromo, abarcando, igualmente, las fibras polipeptídicas naturales y sintéticas teñidas por medio de estos colorantes.

Los compuestos mono-azoicos que sirven para la preparación de los colorantes o tintes metálicos de este procedimiento encierran, una o varias veces, la función sulfamídica terciaria correspondiente a la fórmula -SO₂-N-[alquilo]-C₂H₄-COOH, y llevan, sobre cada uno de los átomos de carbono en posición ‘orto’ con relación al grupo azoico, un grupo metalizable, tal como los grupos hidroxilo o aminado, o un grupo susceptible de ser transformado en un grupo metalizable, tal como el grupo alcoxilo o un átomo de halógeno¹⁰⁴. Los compuestos metálicos descritos en esta memoria encierran un átomo de cromo o de cobalto asociado a dos moléculas de azoicos, que pueden ser idénticas o diferentes, pero en las que, por lo menos una, corresponde a la indicada anteriormente. La *Société Carbochimique S.A.* sostiene en su memoria que estos colorantes metálicos tiñen tanto fibras polipeptídicas naturales como sintéticas, distinguiéndose por sus propiedades tintóreas gracias al grupo carboxílico terminal de la función sulfamídica, -SO₂-N-[alquil]-C₂H₄-COOH; los productos resultantes son muy solubles en agua y poseen, al mismo tiempo, una buena afinidad hacia las fibras polipeptídicas, que tiñen excelentemente a un pH alrededor de 4,5¹⁰⁵.

¹⁰¹ Estos dos efectos dan lugar, por una parte, a una gran solubilidad durante el teñido, a un acabado ‘perfecto’ y, por otra parte, a una solidez muy notable frente a la humedad, cualidades que son, por lo general, difíciles de asociar; además poseen una solidez excelente frente a la luz.

¹⁰² Dentro de los ejemplos que se citan en la memoria, el más representativo es el indicado a continuación: se disuelven 25,5 partes de 4-[N-metil-N-(beta-cianoetil)-sulfamido]-2-amino-fenol en 200 partes de agua y 34 partes de ácido clorhídrico; la disolución se diazota con nitrito de sodio; la suspensión de la sal de diazonio se añade a una solución de 18,4 partes de 1-fenil-3-metil-pirazolona-(5) en 300 partes de agua y 31 partes de carbonato de sosa; cuando la copulación ha terminado, se sala a 5% del volumen y se filtra el colorante; seco tiene el aspecto de castaño rojizo. El colorante mono-azoico se disuelve en 120 partes de formamida, que contiene 10 partes de formiato de cromo; la mezcla se calienta a 120° C durante 1 hora; luego se deja enfriar a temperatura ambiente; se añaden lentamente 500 partes de agua caliente, se deja enfriar y se filtra. La torta formada se calienta a ebullición, durante 15 minutos, con 250 partes de agua y 2 partes de sosa cáustica; se sala a razón del 5% del volumen y se filtra; seco, el colorante constituye un polvo rojo oscuro, soluble en agua, que tiñe las fibras polipeptídicas, particularmente de lana, en baño neutro o débilmente ácido, dando una tonalidad anaranjada, de excelente solidez a la luz y a la humedad, según los autores de esta memoria que comentamos.

¹⁰³ AHOEPM, patente 263.470; la memoria descriptiva consta de siete páginas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid a 21 de diciembre de 1960. La patente española fue aprobada el 3-I-1961 y publicada el 1-III-1961.

¹⁰⁴ Los compuestos portadores pueden prepararse, de acuerdo a lo indicado en la memoria descriptiva, bien por condensación de una alquil-(beta-carboxietil)-amina con un sulfuro, bien por saponificación del grupo -CN de una N-alquil-N-(beta-ciano-etil)-sulfamida en una fase cualquiera de la preparación de los tintes o colorantes.

¹⁰⁵ El teñido de las fibras polipeptídicas, particularmente la lana, cuando se efectúa en esta zona de pH, próxima al punto isoeléctrico de la lana, presenta la gran ventaja de que la fibra conserva su tacto

1.2.7. Sulfamidas derivadas de la pirimidina

Incluimos en este grupo dos procedimientos que, aunque ambos conducen a sulfamidas derivadas de la pirimidina, presentan diferente actividad terapéutica ya que los sustituyentes en el núcleo pirimidínico son diferentes y, además, están en posiciones distintas.

El 11 de febrero de 1961 la empresa suiza *F. Hoffmann-La Roche & Cie. S.A.*, presentó una patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento para la fabricación de las sulfamidas del grupo pirimidínico”¹⁰⁶; el método comprende la condensación de una pirimidina de fórmula general similar a la que sigue a estas líneas, con una sal alcalina de sulfamida o un derivado N⁴-acilo de ésta, si está presente en el producto de condensación.



Pirimidina, fórmula general:

hal.: halógeno [de preferencia cloro o bromo].

R.: alcoxi bajo, tal como metoxi, epoxi, propoxi o isopropoxi.

El procedimiento permite fabricar nuevas sulfamidas condensando una 4-amino-6-alcoxi-6-bajo-pirimidina con un haluro de bencen-sulfónico sustituido en 4, en el que el sustituyente en 4 es convertible al grupo amino, y transformar la 4-sulfanil-amido-6-alcoxi-bajo-pirimidina así obtenida en una sal aceptable.

Según una modalidad del procedimiento, se condensa una 4,6-di-halo-pirimidina, con un sal alcalina de sulfanil-amida o con un derivado N⁴-acilo de ella, produciéndose así 4-sulfanil-amido-6-halo-pirimidina ó 4-(N⁴-acil-sulfanil-amido)-6-halo-pirimidina, respectivamente; el producto de condensación se calienta luego con una solución de un alcóxido bajo de metal alcalino, por ejemplo metóxido, epóxido, propóxido o isopropóxido sódicos, con lo que se reemplaza el sustituyente 6-halo por un grupo alcoxi bajo. Los productos N⁴-acilados, tales como la 4-(N-acetil-sulfanil-amido)-6-metoxi-pirimidina, se hidrolizan posteriormente, por ejemplo con solución de hidróxido sódico, para disgregar los grupos N⁴-acilo, con lo que se obtiene 4-sulfanil-amido-6-alcoxi-bajo-pirimidina¹⁰⁷.

Según otra modalidad, se emplean como materiales de partida una 4-halo-6-alcoxi-bajo-pirimidina, de preferencia 4-cloro-6-metoxi-pirimidina, y una sal alcalina de sulfanil-amida o un derivado N-acilo de ésta. La etapa de condensación se lleva a cabo en presencia de un disolvente inerte y se calienta a temperaturas superiores a 100° C; los

suave. La solidez, en estado húmedo, de los teñidos obtenidos tras este tratamiento resultan característicos y su unión se estima como ‘perfecta’; su solidez a la luz es igualmente excelente.

¹⁰⁶ AHOEPM, patente 264.827; su memoria descriptiva, firmada en Madrid, el 11 de febrero de 1961, consta de 16 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara; como domicilio social de la entidad figura la ciudad de Basilea (Suiza). La patente española fue aprobada el 20-V-1961 y hecha pública el 1-VIII-1961.

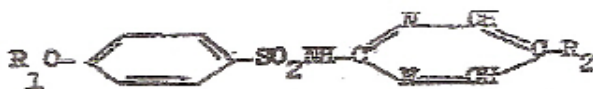
¹⁰⁷ La condensación de la 4,6-di-halo-pirimidina se efectúa en presencia de un disolvente o diluyente inerte, de preferencia dimetil-formamida anhidra. El grupo N⁴-acilo, si está presente en el producto de condensación, puede disgregarse por hidrólisis, por ejemplo con hidróxido sódico, con lo que se produce 4-sulfanil-amido-6-alcoxi-bajo-pirimidina.

productos de condensación N⁴-acilado pueden saponificarse mediante tratamientos con soluciones alcalinas acuosas, con lo que se produce 4-sulfanil-amido-6-alcoxi-bajo-pirimidina¹⁰⁸.

Otra modalidad propone el condensar 4-amino-6-alcoxi-bajo-pirimidina, de preferencia 4-amino-6-metoxi-pirimidina, en presencia de un agente básico de condensación, por ejemplo piridina con un benceno-sulfohaluro en posición 'para', por un sustituyente que puede convertirse al grupo amino, con lo que se forma 4-sulfanil-amido-6-alcoxi-bajo-pirimidina¹⁰⁹. Este procedimiento proporciona, además, como nuevos compuestos, 4-amino-sulfanil-amido-6-alcoxi-bajo-pirimidina, en particular 4-sulfanil-amido-6-metoxi-pirimidina, 4-sulfanil-amido-6-cloro-pirimidina y las sales derivadas de N⁴-acilo de éstas¹¹⁰.

Los compuestos obtenidos mediante este procedimiento pueden emplearse en forma de preparaciones farmacéuticas, utilizando sustancias que no reaccionan con ellos, tales como agua, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, gomas, gelatina, etc. Las sulfamidas obtenidas por este procedimiento, según sus autores, son especialmente útiles contra estafilococos, neumococos y colibacilos.

El 8 de octubre de 1963, la empresa alemana *Schering A.G.* presentó, ante el registro español de patentes, una invención destinada a proteger un "Procedimiento para la fabricación de nuevas sulfamidas de acción reductora de la glucemia"¹¹¹. Su patente parte de sulfamidas con una estructura general similar a la señalada líneas abajo; éstas eran, en el momento de solicitarse la protección, ya bien conocidas por su acción reductora sobre la glucemia, pero presentaban el inconveniente de que su período de actividad era muy breve tras ser aplicadas.



R₁. grupo metilo o etilo.

R₂. grupo metoxi-etoxi, n-propoxi o grupo metilo.

La empresa alemana propuso que las nuevas sulfamidas obtenidas tras cambiar el átomo de oxígeno del agrupamiento OR por un átomo de azufre en la formula general

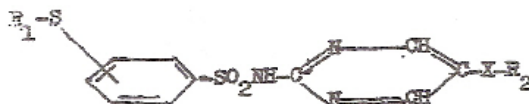
¹⁰⁸ El material de partida, 4-cloro-6-metoxi-pirimidina, puede obtenerse por metanólisis parcial de 4,6-dicloro-pirimidina.

¹⁰⁹ El sustituyente en posición 'para' del reactivo benceno-sulfo-haluro puede ser, por ejemplo, un grupo nitro o un grupo acilamino y, en especial, acetamido. El grupo nitro se convierte a amino por reducción, mientras que el grupo acilamino se trasforma en amino por hidrólisis. El reactivo 4-amino-6-metoxi-pirimidina puede obtenerse por metanólisis de 4-amino-6-halo-pirimidina, de preferencia 4-amino-6-yodo-pirimidina, por reacción con amoníaco líquido, con lo que se reemplaza uno de los átomos del halógeno por un grupo amino.

¹¹⁰ La memoria técnica se complementa con una larga serie de ejemplos, entre ellos la preparación de 4-sulfanil-amido-6-metoxi-pirimidina.

¹¹¹ AHOEPM, patente 292.294; la memoria descriptiva consta de 16 hojas, escritas a máquina por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 8 de octubre de 1963; como domicilio de la empresa figura Berlin 65, Müllestrasse, 170-172 (Alemania). La patente española fue aprobada el 21-X-1963 y hecha pública el 1-I-1964.

indicada, tenían un buen efecto reductor del azúcar en sangre, y un excelente efecto adicional retardado, muy deseable en un tratamiento prolongado¹¹².



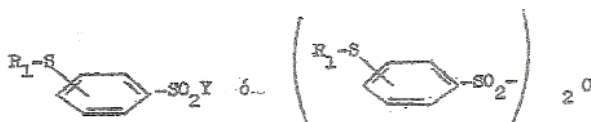
R₁. resto alquilo inferior.

X. enlace directo al estado del núcleo de pirimidina o un átomo de oxígeno.

R₂. resto de hidrocarburo, saturado o no saturado, ramificado o de cadena recta o cerrado en anillo, también puede estar interrumpido por uno o varios átomos de oxígeno.

La preparación de las sustancias puede llevarse a cabo por métodos conocidos haciendo reaccionar los compuestos que se indican:

a) Compuestos de fórmula general como la indicada bajo estas líneas, se hacen reaccionar con 2-amino-5-X-R₂-pirimidina



Y. átomo de halógeno.

R₁. resto alquilo inferior.

X. enlace directo al estado del núcleo de pirimidina o un átomo de oxígeno.

R₂. resto de hidrocarburo, saturado o no saturado, ramificado o de cadena recta o cerrado en anillo, que también puede estar interrumpido por uno o varios átomos de oxígeno.

b) Compuesto de la fórmula general como la señalada más abajo, se hace reaccionar con 2-halógeno-5-X-R₂-pirimidina, donde X y R₂ tienen el significado señalado.



R₁. resto alquilo inferior.

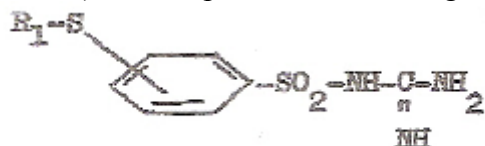
c) Una sal alcalina de las amidas de fórmula general similar a la indicada más abajo, reacciona con una sal del tipo 2-tri-alquil-amonio-5-XR₂-pirimidina, donde X y R₂ tienen el mismo significado que en los casos anteriores.



R₁. resto alquilo inferior.

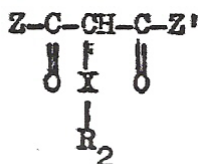
¹¹² En la memoria se adjunta una tabla donde se relaciona la disminución del azúcar en sangre lograda tras la administración de dos compuestos preparados de acuerdo con esta patente; en ella se aprecia que los compuestos obtenidos bajo esta patente tienen una acción superior a los ya conocidos; llama particularmente la atención el que la cuantía de la disminución del azúcar en sangre, por los nuevos compuestos, después de 16 horas, es incluso considerablemente mayor que la disminución lograda al cabo de 4 horas por los compuestos conocidos, desarrollados bajo la patente belga 609.279, a la que ésta utiliza para sus estudios comparativos.

d) Un compuesto de fórmula general del tipo



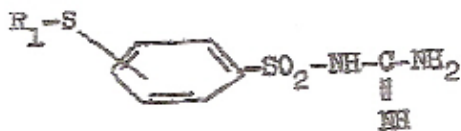
R₁. resto alquilo inferior

reacciona con un compuesto de fórmula general



Z y Z'. átomos de hidrógeno y/o grupos alcoxi.

e) Sulfamidas de fórmula general como la señalada más abajo, reaccionan con beta-dialquil-amino-alfa-X-R₂-acroleínas o con sus acetales, donde X y R₂ tienen el mismo significado que en los casos anteriores.



R₁. resto alquilo inferior.

f) Sulfamidas de fórmula general como la indicada más abajo, reaccionan con estructuras del tipo 2-nitroamino ó 2-cianamino-5-XR₂-pirimidina, donde X y R₂ tienen el mismo significado antes señalado.



R₁. resto alquilo inferior.

g) Ácidos sulfónicos, de fórmula general como la indicada más abajo, reaccionan con 2-acetil-amido-5-X-R₂-pirimidinas, donde X y R₂ tienen el significado señalado.



R₁. resto alquilo inferior.

h) Halogenuros de sulfonilo, de fórmula general como la indicada más abajo, reaccionan con 2-bencil-sulfonil-alamido-3-X-R₂-pirimidinas, donde X y R₂ tienen el mismo significado que en los casos anteriores.



R₁. resto alquilo inferior.

1.2.8. Otras sulfamidas

Agrupamos, en un solo bloque, aquellos tipos de procedimientos para los que tan sólo disponemos de un modelo de patente; se trata de procesos que no tuvieron continuidad en el espacio temporal estudiado pero que, en algunos casos, sí pudieron dar lugar a nuevas líneas de trabajo abordadas con posterioridad a 1964; en otros, se trata de líneas ‘muertas’ que no tuvieron desarrollo y cuyos hipotéticos productos no llegaron a ser comercializados.

1.2.8.a. Isoxazoles

La empresa suiza *F. Hoffmann-La Roche & Cie. S.A.* presentó ante el registro español de patentes, con fecha de 1 de marzo de 1957, un expediente destinado a proteger un “Procedimiento para la preparación de una sulfamida de la serie de los isoxazoles”¹¹³; en realidad, se trata del 5-sulfanil-amino-3,4-dimetil-isoxazol, útil en terapéutica. Este procedimiento se caracteriza por el hecho de someter el colorante azoico, p,p’-bis-[(3,4-dimetil-isoxazolil-5)-amino-sulfonil]-azo-benceno, a reducción en medio fuertemente ácido.

El compuesto de partida puede ser obtenido del modo siguiente: se introduce gradualmente, bajo exclusión de humedad, 74 g. de 4,4’-di-sulfo-cloruro de azobenceno en una solución de 40 g. de 3,4-dimetil-5-amino-isoxazol en 500 ml. de piridina; se remueve la mezcla de reacción durante 8-12 horas a 70° C y se evapora luego la piridina, al vacío, por medio de la trompa de agua. El residuo es liberado, primeramente, de la piridina que se le adhiere, por destilación azeotrópica con agua; después es recuperado en 800-1.200 ml. de sosa cáustica 2 N; el producto de reacción se separa en forma de su sal disódica; se filtra, aspirando a través de un filtro de carbón hasta claridad, y se acidifica por medio de un ácido mineral hasta reacción al rojo congo; de esta manera se separa un colorante azoico, voluminoso, de color rojo-anaranjado; en reposo, se transforma en una masa granulosa. El colorante es aislado por aspiración, después de lavado varias veces con agua y, tras su secado, se obtienen, de acuerdo con los datos de la memoria descriptiva, 93 g. de p,p’-bis-[(3,4-dimetil-isoxazolil-5)-amino-sulfonil]-azobenceno tras nueva cristalización en alcohol al 80%, el compuesto funde a 209°-211° C¹¹⁴.

Según un modo de puesta en práctica del procedimiento, se reduce catalíticamente el p,p’-bis-[(3,4-dimetil-isoxazolil-5)-amino-sulfonil]-azobenceno con hidrógeno; como catalizador se utiliza carbón paladio o platino. La reacción puede ser efectuada en un disolvente, por ejemplo ácido acético glacial, al que se añade, por ejemplo, ácido sulfúrico acuoso como agente acidificante. Los autores de la memoria indican que han encontrado ventajosa la utilización del ácido sulfúrico como agente acidificante, el efectuar la reacción con una sobre-presión ligera y a una temperatura

¹¹³ AHOEPM, patente 233.958; la memoria descriptiva, compuesta por seis hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara, está fechada en Madrid, a 1 de marzo de 1957; como domicilio social de la empresa consta el número 124 Grenzacherstrasse, en Basilea (Suiza). La patente española fue aprobada el 2-VII-1957 y publicada el 16-X-1957.

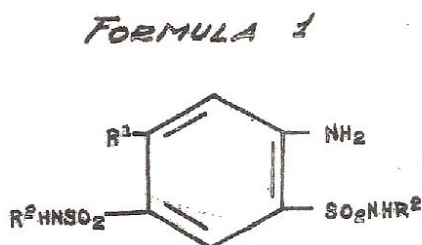
¹¹⁴ El medio fuertemente ácido, preciso para efectuar la reacción del procedimiento, es creado por la adición de agentes acidificantes, en particular aquéllos de carácter electrófilo pronunciado; son especialmente adecuados los ácidos minerales, tales como los ácidos sulfúrico y clorhídrico.

levemente elevada permite evitar la separación de un compuesto hidrazoico sulfúrico poco soluble.

Otro modo operatorio señalado en la memoria consistente en hacer reaccionar ácido clorhídrico concentrado con p,p'-bis-[(3,4-dimetil-isoxazolil-5)-amino-sulfonil]-azobenceno en presencia de estaño metálico, de sales de estaño divalente o de una combinación de estaño y de sales de estaño divalente. La reacción puede ser efectuada, igualmente, en presencia de un disolvente orgánico, tal como el alcohol¹¹⁵.

1.2.8.b. Disulfamidas

El 6 de noviembre de 1958 la empresa *Merck & Co. Inc.*, amparada bajo nacionalidad norteamericana, presentó ante el registro español una patente de invención al objeto de proteger un "Procedimiento para preparar compuestos de sulfamidas"¹¹⁶, concretamente compuestos de disulfamilanilina, de estructura general representada por la fórmula 1



R¹ representa un halógeno, como cloro, bromo o flúor, un radical alquilo ligero de 1 a 5 átomos de carbono, un radical alcóxido ligero, también de 1 a 5 átomos de carbono en su porción alquímica o un grupo nitro o amino.

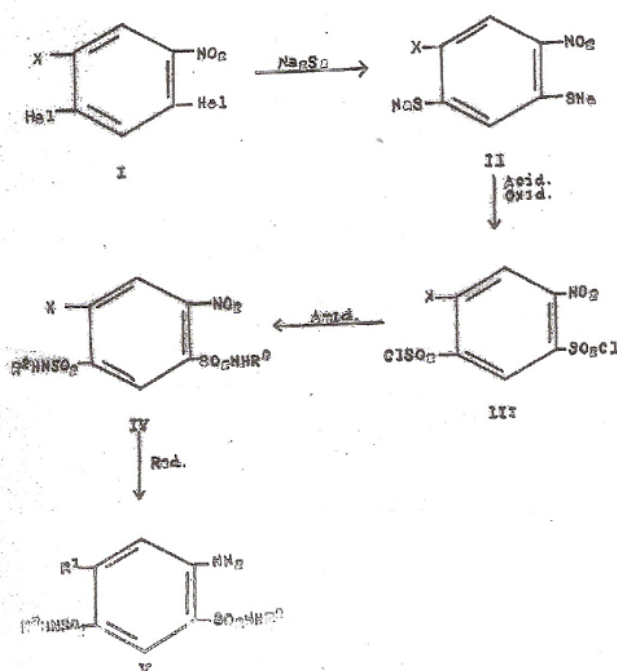
R² representa un hidrógeno o un radical alquilo ligero, mejor con 1 a 5 átomos de carbono.

El procedimiento de obtención de este producto se representa por una serie de reacciones expuestas, como fórmula 2, en la memoria descriptiva:

¹¹⁵ En la memoria descriptiva se ilustra el procedimiento proponiendo una serie de ejemplos en los cuales se parte de una suspensión de 2 g. de p,p'-bis-[bis(3,4-dimetil-isoxazolil-5)-amino-sulfonil]-azo-benceno, que se hidrogena usando diversos catalizadores, como carbón al paladio, óxido de paladio o estaño divalente, para obtener, en todos los casos, una solución de 5-sulfanil-amido-3,4-dimetil-isoxazol, que es prácticamente incolora.

¹¹⁶ AHOEPM, patente 245.390; la memoria descriptiva consta de once páginas, escritas por una sola cara; queda fechada en Barcelona, a 6 de noviembre de 1958; como domicilio social de la empresa figura el número 126 de East Lincoln Avenue, en Rahway (New Jersey, EE. UU.). La patente española fue aprobada el 24-XI-1958 y publicada el 1-V-1959.

FORMULA 2



Hal. representa un halógeno, con preferencia cloro o bromo.

R^1 representa un halógeno, como cloro, bromo o flúor, un radical alquilo ligero de 1 a 5 átomos de carbono, un radical alcoxilo ligero, de 1 a 5 átomos de carbono en su porción alquílica o un grupo nitro o amino.

R^2 representa un hidrógeno o un radical alquilo ligero, mejor con 1 a 5 átomos de carbono.

X representa un halógeno, un radical alquilo ligero, un radical alcoxilo ligero o un grupo nitro.

Este procedimiento para preparar compuestos de disulfamylanilina comprende la conversión de un 2,4-di-halo-nitrobenceno [compuesto I], por tratamiento con disulfuro sódico, en una sal disódica de 2,4-di-mercapto-nitrobenceno [compuesto II]. El di-mercapto-nitrobenceno se oxida luego, para formar un cloruro de nitrobenzen-2,4-disulfonilo [compuesto III] que, una vez amidado, origina el correspondiente disulfamilderivado [compuesto IV]. El grupo nitro del 2,4-disulfamil-nitrobenceno [compuesto IV] se reduce al grupo amino, formando así el correspondiente 2,4-disulfamil-anilin-derivado [compuesto V].

Los autores de este procedimiento le confieren particular utilidad porque evita el empleo del ácido clorosulfónico en la preparación del cloruro de disulfonilo, que es indeseable en el aspecto de la producción en gran escala, pues es necesario emplear cloruro sódico con ácido clorosulfónico para obtener cantidades adecuadas del cloruro de disulfonilo intermedio; la mezcla de reacción se hace difícil de manejar mecánicamente al adoptar una consistencia pastosa; todas las etapas del procedimiento se desarrollan a temperatura moderada, lo que constituye otra ventaja más para la fabricación del producto a gran escala.

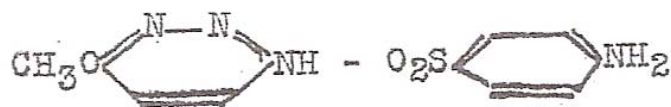
El procedimiento objeto de esta patente se practica preparando una solución de disulfuro sódico, que se agrega luego a una solución de 2,4-di-halo-nitrobenceno [compuesto I], elegido para formar la sal disódica de 2,4-di-mercapto-nitro-benceno [compuesto II]. Los cuerpos reaccionantes pueden disolverse en un medio acuoso o en alcohol y se emplean en proporción de 1 mol de disulfuro sódico por cada mol de 2,4-di-cloro-nitro-benceno elegido¹¹⁷. El di-mercapto-derivado [compuesto II] se oxida luego por tratamiento con cloro, en un medio acidificado, bien mediante adición de ácido acético o de ácido clorhídrico concentrado, bien empleando mezclas de ácido clorhídrico concentrado y de ácido nítrico o ácido acético, o similares, mientras se mantiene la temperatura entre 0°-10°C aproximadamente; conviene pasar el cloro en

¹¹⁷ Al efectuar esta fase es conveniente añadir, en porciones, una de las soluciones, por ejemplo la de disulfuro, a la otra pues la reacción es energética y exotérmica.

burbujas a la mezcla de reacción a poca velocidad, y así se obtiene el correspondiente cloruro de nitro-bencen-2,4-disulfonilo [compuesto III]. Este compuesto III de disulfonilo se amida por reacción con no menos de cuatro equivalentes molares de amoníaco¹¹⁸; con preferencia, la mezcla de reacción se enfría en un baño de hielo, y se calienta luego, mejor en baño de vapor, para obtener el correspondiente compuesto de 2,4-disulfamil-nitro-benceno [compuesto IV]. El grupo nitro del 2,4-disulfamil-nitro-benceno [compuesto IV] se reduce a grupo amino por catálisis, empleando, por ejemplo, un catalizador de platino o de paladio sobre carbón vegetal; o bien químicamente, por ejemplo con hierro o en un medio ácido o alcalino, en forma de hierro en polvo y ácido clorhídrico, o de sulfato ferroso o hidróxido amónico; también puede efectuarse la reducción química con hidrosulfuro sódico y sus análogos, para formar el 2,4-disulfamil-anilín-derivado [compuesto V] que interesa¹¹⁹.

1.2.8.c. Sulfamido-metoxi-piridazinas

La firma *Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A.*¹²⁰ presentó en el registro, con fecha de 24 de enero de 1959, un expediente de patente de invención, destinado a proteger “Un perfeccionamiento de preparación de una sulfamida”¹²¹. El procedimiento intenta introducir mejoras en el proceso de preparación de un compuesto sulfamídico, sulfamido-metoxi-piridazina, de fórmula como la indicada



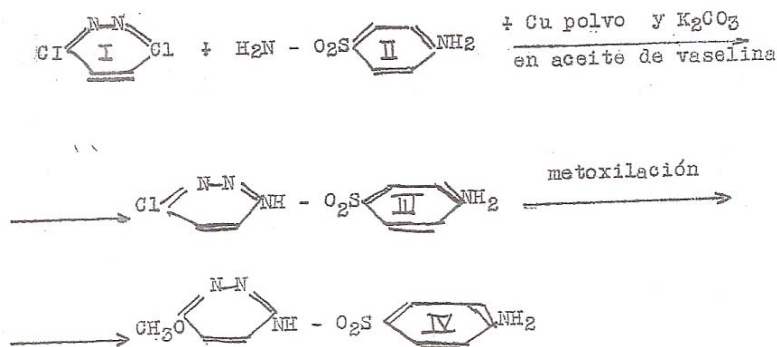
Este producto se obtiene mediante una serie de reacciones que tomamos de la propia memoria presentada a registro:

¹¹⁸ En la fase de amidación se puede emplear amoníaco en cualquier forma, por ejemplo como hidróxido amónico acuoso alcohólico o amoníaco líquido, disolviendo el cloruro de disulfonilo en un disolvente orgánico y burbujeando amoníaco gaseoso en la solución para formar el disulfamilderivado.

¹¹⁹ En la memoria descriptiva se incluyen unos ejemplos que ilustran la aplicación del método en la preparación de los compuestos de disulfamil-anilina siguientes: 5-cloro-2,4-disulfamil-anilina, 5-propoxi-2,4-disulfamil-anilina, 5-metil-2,4-di-N-metilsulfamil-anilina, 5-nitro-4-disulfamil-anilina, 5-amino-2,4-disulfamil-anilina.

¹²⁰ La empresa, distribuidora española de los productos A. Wasserman S.A., estaba instalada, en 1924, en el número 25 de la calle Fomento de Barcelona (*Ideal Médico*, 8(86): 157. Córdoba, 1924); en 1939 figura en el número 63 de la misma calle (*La Vanguardia*, 9-V-1939: 3), entonces utilizaba el equipo comercial construido por J. Uriach y Cia. S.A.; en junio de 1955 consta como domiciliada en el número 173 de la avenida de San Antonio María Claret (Barcelona) (*vide infra*).

¹²¹ AHOEPM, patente 246.746; la memoria descriptiva se compone de cuatro hojas mecanografiadas por una sola cara; queda fechada, en Madrid, a 24 de enero de 1959; como domicilio social de la empresa se indica el número 173 de la avenida de San Antonio María Claret, en Barcelona. La patente, de invención, fue concedida el 10-II-1959 y publicada el 16-V-1959.



El elemento esencial de esta patente es el perfeccionamiento, nuevo y práctico, con el cual se efectúa la primera reacción, en la que se consigue cloro-sulfamido-piridazina, la cual se logra, al parecer con buen rendimiento, calentando, hacia 200° C, 3,6-dicloro-piridazina (I) con para-amino-benceno-sulfamida (II), en presencia de carbonato potásico¹²². La segunda reacción, que consiste en metoxilar la cloro-sulfamido-piridazina obtenida mediante la primera reacción, se consigue con los procedimientos clásicos, bien introduciendo directamente el grupo metoxilo (CH₃-O-) en lugar del átomo de cloro, o bien metilando el hidroxilo intermedio con diazometano¹²³. A continuación, la 3-6-dioxo-piridazina se clora con agentes halogenantes, en presencia de AlCl₃ anhidro como catalizador de la halogenación¹²⁴.

El procedimiento propuesto por esta empresa española presenta algunos inconvenientes: es adecuado pensar que, además de los productos intermedios y final que se obtienen en esta serie de reacciones de síntesis, se vayan formando, en cada una de las etapas del proceso, otros productos parásitos, como consecuencia de reacciones colaterales que no se mencionan en la memoria descriptiva y, en consecuencia, el producto final será una mezcla del producto deseado y de otros productos parásitos¹²⁵. En la memoria presentada al registro de patentes no se aclara cómo impedir estas

¹²² Como catalizador de la reacción se emplea polvo de cobre, haciendo transcurrir la reacción en una fase fluida, utiliza como vehículo de dicha reacción el aceite de vaselina, el cual permite mantener una energética agitación en toda la masa, pudiendo aprovecharse al máximo la acción del catalizador y agotar la reacción.

¹²³ Del mismo modo se logra la última transformación (metoxilación); asimismo, el producto de partida, la dicloro-piridazina, se obtiene por cualquier medio adecuado, por ejemplo condensando el anhidrido maleico con la hidrazina, con formación de la 3,5-dicloro-piridazina.

¹²⁴ En la memoria se describe un caso de realización práctica a título de ejemplo: en un matraz de ½ litro, de fondo redondo, provisto de un enérgico agitador, calentado en baño de aceite, se hacen reaccionar: 29,8 g. de 3,6-di-cloro-piridazina con 48 g. de p-amino-benceno-sulfamida, añadiendo 48 g. de carbonato de potasio anhidro, 3,5 g. de cloruro potásico, 0,075 g. de polvo de cobre y 325 cc. de aceite de vaselina; se calienta hasta alcanzar la temperatura de reacción de 160°-180° C, manteniendo en constante agitación y dejando desprender el CO₂ que se forma; para agotar la reacción se calienta hacia el final a 200°-210° C; se deja enfriar la masa separando, por decantación, el aceite de la vaselina del residuo, el cual se lava con éter; dicho residuo se disuelve con agua hirviendo, se filtra todavía caliente para recuperar el catalizador y, de la solución filtrada, se separa por cristalización el exceso de sulfamida que no ha reaccionado. La solución filtrada contiene cloro-sulfamido-piridazina que, acidificando con ácido acético a un pH 3,5-4, se separa; filtrada y nuevamente cristalizada, funde a 192°-193° C.

¹²⁵ Así, la 3,6,dicloro-piridazina puede reaccionar al mismo tiempo con sus dos cloros, con lo cual ya aparecería una sustancia parásita. También es posible que la para-amino-sulfamida reaccionase también por medio de un grupo amino, con lo que se forman nuevos parásitos, los cuales, al realizar la metoxilación final, puedan originar nuevos compuestos.

reacciones y, en el caso de que se forme alguna sustancia extraña a los intereses de la invención, cómo se debe eliminar ésta sin tener pérdidas del producto deseado, o al menos que éstas resulten económicamente tolerables. No parece que la propuesta estuviera suficientemente matizada como para llevarla de inmediato a la práctica.

1.2.8.d. Sulfamidas asociadas a compuestos argénticos

Con fecha de 25 de octubre de 1960 Jesús Camón Cano¹²⁶ presentó una patente de invención al objeto de proteger un “Procedimiento para suprimir la toxicidad de las sulfamidas administradas por vía digestiva, por medio de los efectos sinérgicos de su asociación con un tipo especial de coloide de plata”¹²⁷. La patente se refiere a un compuesto de adsorción, ya experimentado por el autor con reconocida efectividad curativa, formado por un caolín finamente pulverizado en el que, sobre su superficie, se han hecho depositar las micelas de un coloide de plata convenientemente preparado; la composición del producto lleva al autor a definirle como un caolín plateado coloidal, totalmente insoluble en los medios sobre los que se dispersa.

Este compuesto de adsorción, en su recorrido a lo largo del aparato digestivo, conserva inalteradas sus propiedades bactericidas y catalíticas de oxidación características de su factor activo: el coloide metálico puro; de forma que, así preparado, se hace resistente a las acciones coagulantes o disolventes de los jugos digestivos y, finalmente, se elimina con las deyecciones, después de haber permanecido durante algún tiempo tapizando y recubriendo las paredes del tubo digestivo. Además, según este autor, tampoco inhibe el desarrollo de procesos fermentativos a través de los cuales se sintetizan factores nutritivos o vitamínicos¹²⁸. Jesús Camón Cano remite a un trabajo experimental previo en el que quedó demostrada la eficacia terapéutica y la no toxicidad del caolín plateado coloidal, administrado por vía digestiva, tanto en terapia humana como en veterinaria, aún en tratamientos muy intensos y prolongados.

El problema de la toxicidad de las sulfamidas administradas por vía digestiva restringió el empleo de estos medicamentos; Jesús Camón Cano presenta, en la memoria de este expediente, los datos experimentales por él acumulados, principalmente en avicultura, que se pueden concretar en los siguientes:

¹²⁶ Jesús Camón Cano, doctor en Ciencias Químicas, de origen aragonés, fue auxiliar de la Facultad de Ciencias de Zaragoza durante la guerra civil; en 1939 fundó, junto a Antonio de Gregorio Rocasolano (Zaragoza, 1873 - Zaragoza, 1941), el *Laboratorio Argenol*, dedicado, desde su fundación, a la fabricación de productos derivados de la plata que, por sus propiedades bactericidas, tienen gran aplicación terapéutica. El *Laboratorio Argenol* continúa activo [<http://www.laboratorios-argenol.com/>].

¹²⁷ AHOEPM patente 262.752; esta memoria descriptiva consta de ocho hojas foliadas y mecanografiadas a dos espacios y por una de sus caras; está firmada en Madrid, a 25 noviembre de 1960; como domicilio social de la empresa figura el número 19 de la calle Pradilla, en Zaragoza. La patente fue concedida el 5-XII-1960 y publicada el 5-XII-1961.

¹²⁸ Los tipos de coloides de plata empleados en terapéutica para otros fines, como proteinato de plata, vitelinato de plata o plata coloidal, son perfectamente solubles en agua destilada y otros medios neutros, pero extraordinariamente sensibles al cambio de pH del medio, en especial al acidificarse éste, como sucede en el estómago, donde se produce una coagulación que puede ser irreversible y, en este caso, se tiene como consecuencia una pérdida de la eficacia de la acción del producto, al no poseer las micelas del coloide de plata el grado de dispersión primitivo. Las proteínas que constituyen los estabilizadores de estos tipos de coloides, que pueden ser considerados como sales orgánicas de plata, al quedar sometidas a procesos digestivos, pueden dar lugar, en medio alcalino, a la formación de complejos de plata solubles, capaces de atravesar las paredes intestinales, pasar a la sangre y, posteriormente, formar depósitos coloreados de plata metálica en el interior de los tejidos.

- Dosis insuficientes de caolín coloidal pueden prolongar la duración de una infección intestinal, pero ésta se vence fácilmente empleando entonces una sulfamida curativa.

- Cuando los tratamientos realizados por sulfamidas no han alcanzado rápido éxito, el sustituir entonces las sulfamidas por caolín plateado coloidal produce curas espectaculares.

- Sobre las aves intoxicadas con sulfamidas, el caolín plateado coloidal ha demostrado poseer una eficacia rapidísima, recuperándose con extraordinario vigor las aves afectadas.

- Cuando simultáneamente se suministran a las aves sulfamidas y caolín coloidal, esta asociación, por sus efectos sinérgicos, aumenta la eficacia que, aislados, poseen ambos productos.

Como comprobación de sus postulados, el autor presenta un ensayo en aves: un lote de doce aves sanas se somete a un tratamiento tóxico y continuo de un producto anticoccidiósico, sulfaquinoxalina sódica, adicionando en el agua de bebida la dosis de 5 g. por litro, o sea de cinco a diez veces mayor que la dosis recomendada como curativa; ello produce la muerte de todas las aves en un plazo de 7 a 8 días, comprobándose por autopsia que la causa de la muerte es, en todos los casos, nefritis aguda. Simultáneamente, sobre otro lote igual de aves, sometidas al mismo tratamiento tóxico, al que al mismo tiempo les administraba una dosis de caolín plateado coloidal mezclado con el pienso de 15 g. por kilo, es decir la dosis normal recomendada como curativa, solo aparece una baja por nefritis; en las once aves restantes no se produjo ninguna muerte, ni aún al cabo de 18 días en que se mantuvo este tratamiento; tras finalizar la experiencia aparecieron algunos síntomas de intoxicación, tras ella se sacrificaron dos de estas aves y su autopsia demostró, en una de ellas, nefritis discreta y, en la otra, solamente ligera nefritis.

1.2.8.e. Sulfamidas indólicas

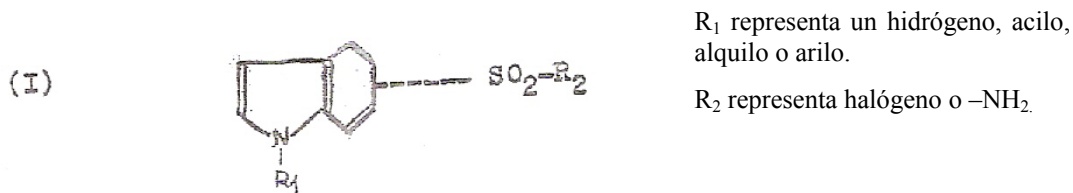
El 28 de junio de 1961 la empresa alemana *Chemische Fabrik von Heyden A.G.* presentó, ante el registro español, una patente destinada a proteger un “Procedimiento para la fabricación de halogenuros de ácido sulfónico y sulfamidas del indol y de sus derivados”¹²⁹. Los autores de la memoria apuntan, en la introducción justificativa, que los restos de halogenuro sulfónico, en el benceno del sistema indol, dificultan la fabricación de algunas sulfamidas empleadas como producto intermedio en la fabricación de medicamentos; ello es debido a:

- La reactividad extraordinaria del anillo pirrólico en el sistema indol que encauza sustituyentes, casi exclusivamente, en posición 1,2,3.

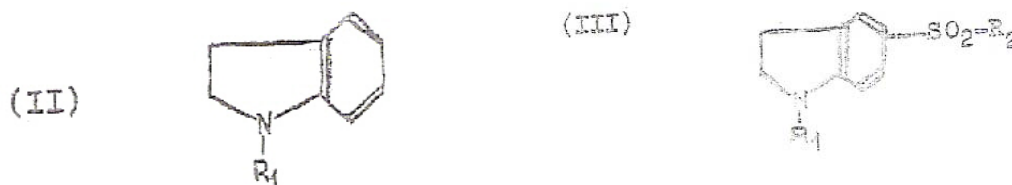
- La sensibilidad, relativamente grande, del sistema heterocíclico respecto a condiciones de reacción más fuertes en presencia, por ejemplo, de ácido cloro-sulfónico, ácido sulfúrico concentrado y otros agentes que efectúen la transformación de un sustituyente ya existente en el halogenuro de ácido sulfónico o en un grupo sulfamida.

¹²⁹AHOEPM, patente 268.685; la memoria descriptiva consta de cinco hojas, numeradas y mecanografiadas por una sola cara; queda fechada, en Madrid, a 28 de junio de 1961; como domicilio social de la empresa se hace constar München-23 (Alemania). La patente española fue aprobada el 17-X-1961 y hecha pública el 16-XII-1961.

Para solventar estas dificultades, los proponentes aportan una reacción sencilla, y al parecer con buenos rendimientos, que permite llegar a obtener halogenuros de ácido sulfónico o sulfamidas de indol de la fórmula general indicada bajo estas líneas [fórmula I]



De acuerdo con esta propuesta se transforma, primero, 2,3-dihidroindoles (indolitas) de la fórmula general tipo II, con ayuda de un halogenuro de ácido sulfónico, preferentemente de ácido cloro-sulfónico, en los halogenuros de ácido sulfónico de la fórmula tipo III y se somete, a las amidas obtenidas de ellos para la transformación en los correspondientes derivados de indol, a una reacción de deshidrogenación.



En el procedimiento propuesto, el método de actuación sería el siguiente: en primer lugar, un 2,3-dihidroindol, eventualmente acetilado, se hace reaccionar con un exceso de halogenuro de ácido sulfónico, aislando -después de la descomposición con agua- el halogenuro de 2,3 dihidroindol-sulfónico; posteriormente, el producto así obtenido se deja transformar, de acuerdo con métodos conocidos, en 2,3-dihidroindol-sulfamida.

La transformación de los derivados de ácido 2,3-dihidroindol-sulfónico así producidos en las combinaciones del indol, con dos átomos de hidrógeno menos, puede efectuarse mediante deshidrogenación, de la manera habitual¹³⁰. Las combinaciones obtenidas por este procedimiento se pueden emplear como productos intermedios en la fabricación de medicamentos antidiabéticos¹³¹.

El método propuesto supone una novedad pero, en los procesos reactivos que se indican en la memoria, es posible que se originen reacciones parásitas, produciéndose compuestos indeseables que perjudican la correcta obtención del producto apetecido. En la memoria se realiza una reacción con halogenuro de un ácido sulfónico, no concretándose en qué posición, dentro de anillo bencénico, entra el nuevo sustituyente;

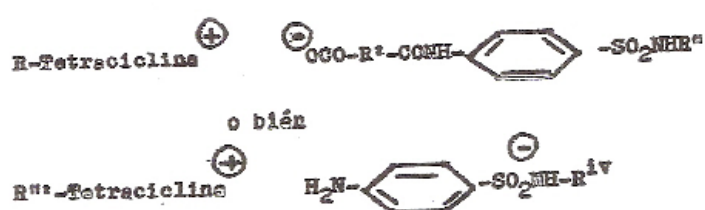
¹³⁰ Esta deshidrogenación puede hacerse con ayuda de tetracloruro-p-quinona (cloranilo) u otra quinona, o por acción de agentes de oxidación como HgO, H₂O₂, peróxidos inorgánicos u orgánicos, con catalizadores para la deshidrogenación.

¹³¹ En la memoria se propone un ejemplo práctico de obtención de una sulfamida de indol: la N-acetil-indolina se hace reaccionar con ácido clorosulfónico; el cloruro de ácido N-acetil-indolin-sulfónico formado se introduce en agua amoniacal. Una vez completada la reacción, se aspira toda la solución con carbono activo y se acidula con ácido acético, logrando sulfamida de N-acetil-indolina; de ella se obtiene la sulfamida indólica libre, que se hierve con cloranilo, formándose la sulfamida del indol.

parece indicar que ésta es una cuestión indiferente, en lo concerniente a la obtención del derivado indólico en cuestión; sin embargo, ocurre con frecuencia que, entre compuestos isómeros, uno es más útil que otro, por lo que la posible combinación de ambos origina una mezcla de productos quizás terapéuticamente menos activa que el isómero más activo.

1.2.8.f. Sulfamidas asociadas a tetraciclinas

Con fecha 16 de mayo de 1963, una empresa española, *Antonio Gallardo S.A.*¹³², presentó a registro una patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento para la preparación de sales de sulfamida con tetraciclina y sus derivados”¹³³. El procedimiento objeto de la patente permite la preparación de productos cuyas fórmulas generales son del tipo que se expone



Estos compuestos tienen gran interés terapéutico por poseer un amplio espectro de actividad antibacteriana; además, dada su poca solubilidad, es posible preparar suspensiones estables para uso oral. La síntesis de tales compuestos se lleva a cabo por reacción directa de una sulfamida unida a un ácido di-carboxílico con una tetraciclina base, mediante ebullición en diferentes disolventes orgánicos. La separación del compuesto puede realizarse mediante cristalización por adición de otro disolvente o agua.

Otro procedimiento, expuesto en esta misma memoria, consiste en la preparación de la sal de sulfamida y tetraciclina por doble descomposición de una sal de tetraciclina con un anión orgánico o inorgánico, con una sal de sulfamida con un catión metálico u orgánico en solución acuosa o bien en disolvente orgánico. El autor ilustra su memoria con unos ejemplos aclaratorios¹³⁴.

¹³² Se trata de la empresa fundada por Antonio Gallardo Carrera (n. 1908 - Barcelona, 1988), delegado de *Air France* en Barcelona, quien, en diciembre de 1944, adquirió de Victor Almirall Riu el *Laboratorios Almirall*, domiciliado en Barcelona el cual, desde entonces, pasó a denominarse *Laboratorio Antonio Gallardo*; en febrero de 1951 la propiedad se transforma en *Antonio Gallardo Sociedad en Comandita*, en 1954 el *Laboratorio Antonio Gallardo S.C.* traslada su sede a la calle Cardener, en Barcelona; desde enero de 1957 adopta la estructura de sociedad anónima y, en 1972, inaugura una factoría en Sant Andreu de la Barca. Tras la muerte de Antonio Gallardo, en 1988, la entidad volverá a denominarse *Laboratorios Almirall* (cf. Nuria PUIG. “Antonio Gallardo Carrera”. En: Francesc Cabana (ed.). *Cien empresarios catalanes*: 506-514. Madrid: LID, 2006).

¹³³ AHOEPM patente 282.689; la memoria descriptiva consta de cinco hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara; están firmadas en Madrid, a 21 noviembre de 1962; como domicilio social de la empresa figura el número 72 de la calle Cardoner, en la ciudad de Barcelona. La patente fue concedida el 25-I-1963 y publicada el 16-V-1963.

¹³⁴ En un primer caso suspende 37 g. de tetraciclina anhidra en 300 ml. de alcohol metílico, se añaden, con agitación, 8 g. de tetrahidro-1,4-oxacina y 7.3 g. de solución de formaldehído al 37%; la mezcla resultante se agita durante 15 minutos y, a continuación, se hierve a reflujo durante 15 minutos

Incerta saedis

A éstas debe añadirse un expediente, presentado por Juan Martí Camp y José Alberti Gubern, con fecha de 7 de julio de 1951; concierne a un “Procedimiento de obtención de una sulfamida insoluble”; lamentablemente no conservamos la memoria técnica, lo que nos imposibilita un acercamiento a su contenido¹³⁵.

Grupo de patentes	Período	Número de patentes
1. Amino-fenil-sulfamidas	1938	1
2. Amino-benzol-sulfamidas	1939-1961	16
3. Derivados halogenados de sulfamidas	1942-1950	4
4. Derivados tiazólicos de sulfamidas	1946-1955	2
5. Toluol-sulfamidas	1947-1948	2
6. Colorantes azoicos	1960	2
7. Sulfamidas derivadas de la pirimidina	1961-1963	2
8. Otras sulfamidas		
8.a. Isoxazoles	1957	1
8.b. Disulfamidas	1958	1
8.c. Sulfamido-metoxi-piridazinas	1959	1
8.d. Sulfamidas asociadas a compuestos argénticos	1960	1
8.e. Sulfamidas indólicas	1961	1
8.f. Sulfamidas asociadas a tetraciclinas	1962	1
‘Incerta saedis’	1951	1
Total		36

más; cuando la mezcla aún está caliente, se añaden, con agitación, 29,8 g. de succinil-sulfa-dimetoxina en 300 ml. de alcohol metílico caliente y 300 ml. de agua, luego se deja reposar durante 24 horas; el compuesto resultante, sulfa-dimetoxi-succinato de N-tetrahidro-1,4-oxacin-metil-tetraciclina, se separa por filtración; se obtienen 65 g. del producto, lo cual representa un 98% de rendimiento. En el segundo ejemplo, se disuelven 40,3 g. de ftalil-sulfa-tiazol en una mezcla constituida por 200 ml. de agua que llevan disueltos 10,6 g. de carbonato sódico anhidro; aparte se disuelven 48 g. de clorhidrato de tetraciclina en 500 ml. de agua; la solución resultante se añade a la de la sulfamida preparada anteriormente; se agita fuertemente y se formará un precipitado inmediato de sulfa-tiazolil-ftalato de tetraciclina; el rendimiento es del orden del 95%. En un tercer caso, se disuelven 31 g. de sulfa-dimetoxina en 200 ml. de agua alcalinizada con 10,6 g. de carbonato sódico anhidro; aparte se prepara una solución de 48 g. de clorhidrato de tetraciclina en 500 ml. de agua; la solución resultante se añade a la anteriormente preparada con enérgica agitación; rápidamente se separa un precipitado insoluble de la sal de tetraciclina con sulfa-dimetoxina.

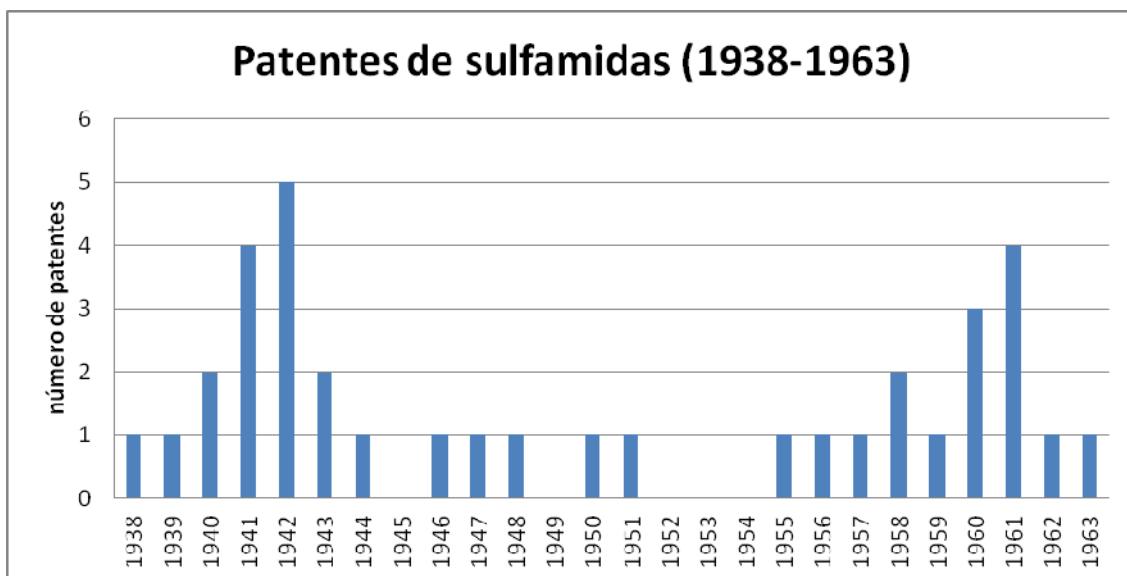
¹³⁵ AHOEPM, patente 198.785; esta patente, de introducción, fue aprobada el 9-XI-1951 y publicada el 16-XII-1951.

1.3. Las empresas interesadas en el registro de sulfamidas

La tabla que sigue recoge la distribución del número de registros de sulfamidas presentados en España, ordenados por años y organizados en función de los países en que fijaron su residencia las empresas interesadas en su registro.

Distribución del número de patentes de sulfamidas registradas en España (1936-1963)						
Año	España	Alemania	Suiza	EE. UU.	Bélgica	Total
1938	1	-	-	-	-	1
1939	-	1	-	-	-	1
1940	1	1	-	-	-	2
1941	1	1	2	-	-	4
1942	2	2	1	-	-	5
1943	1	1	-	-	-	2
1944	1	-	-	-	-	1
1945	-	-	-	-	-	-
1946	-	-	-	1	-	1
1947	1	-	-	-	-	1
1948	1	-	-	-	-	1
1949	-	-	-	-	-	-
1950	1	-	-	-	-	1
1951	1	-	-	-	-	1
1952	-	-	-	-	-	-
1953	-	-	-	-	-	-
1954	-	-	-	-	-	-
1955	1	-	-	-	-	1
1956	1	-	-	-	-	1
1957	-	-	1	-	-	1
1958	-	-	1	1	-	2
1959	1	-	-	-	-	1
1960	1	-	-	-	2	3
1961	-	1	3	-	-	4
1962	1	-	-	-	-	1
1963	-	1	-	-	-	1
Total	16	8	8	2	2	36

Los datos ponen de manifiesto el interés ascendente despertado hasta 1942 y la preponderancia, hasta 1943, de las empresas germanas en el registro de patentes relacionadas con sulfamidas. Este interés decrece a partir de la segunda mitad de la década de 1940, para vislumbrarse un nuevo florecer en los finales de la década de 1950, ahora fundamentado en registros de empresas suizas y belgas, más interesadas en la utilización de las sulfamidas como antiglucémicos o en su aplicación para la industria textil.



1.3.1. Las empresas españolas

Trece empresas españolas muestran su interés por registrar patentes relacionadas con sulfamidas. En plena guerra civil, la primera aportación hispana, una patente de introducción, es registrada por Esteve Subirana [*Laboratorios Dr. Esteve*] quien, en abril de 1938, señala un procedimiento para preparar para-amino-fenil-sulfamida, el cual, aunque ya había sido objeto de utilización en el extranjero, no lo había sido aún en España (AHOEPM, patente 144.173).

Unos años después, en febrero de 1940, serían los hermanos Andreu Miralles, Juan y José [*Laboratorios Dr. Andreu*] quienes, siguiendo modelos alemanes, registran un método perfeccionado para la obtención de la para-amino-benceno-sulfamida; pretenden evitar con él la presencia de las sulfonas inútiles que se forman en el proceso de fabricación de las sulfamidas, logrando así una deseada mejora en los procedimientos técnicos de fabricación de estos productos (AHOEPM, patente 149.121).

En diciembre de 1941 es Clemente Sierra, domiciliado en Bilbao, quien propone un método para obtener, por separado, los isómeros de amino-benzol-sulfamida, lo que constituye una mejora significativa al lograr el producto deseado (AHOEPM, patente 155.394).

En los comienzos de 1942, el *Instituto Farmacológico Latino S.L.* se adentra en modelos de producción de sulfo-halogenuros, ya abordadas con anterioridad por otras empresas europeas del sector. La propuesta del *Instituto Farmacológico Latino S.L.* se centra en cuestiones de fabricación que complementan las propuestas alemanas y suizas: apunta los inconvenientes de los métodos ya conocidos, principalmente la presencia de derivados del ácido sulfanílico, con caracteres ácido y básico, lo que implica la posibilidad de diversas reacciones entre estos compuestos; su propuesta sugiere paliarlo disolviendo las sustancias, cuya reacción entre sí se desea, en disolventes adecuados, como por ejemplo piridina (AHOEPM, patente 155.966).

Ya más tardía, de junio de 1956, aunque también relacionada con las sulfamidas sustituidas en el grupo amido, es la propuesta formulada por el *Laboratorio Martín Cuatrecasas* en la que expone, como novedad, la posible obtención de derivados de las sulfamidas empleando, entre otras materias primas, urea o ureas sustituidas (AHOEPM, patente 229.154).

Los procedimientos para formular ‘sulfamidas halogenadas’ quedan firmados por un par de investigadores españoles: Jacinto Megías Fernández, director del madrileño *Instituto Llorente* y Ramón de Montaner Giraudier. En abril de 1942, Jacinto Megías Fernández, partiendo del conocimiento que las sulfamidas son antisépticos y que, con el mismo fin, son válidos diversos compuestos del benceno bromados en el núcleo, preparó derivados bromados en el núcleo de las sulfamidas (AHOEPM, patente 156.752); su procedimiento puede considerarse como precursor de los que luego desarrollaría Ramón de Montaner, pero el autor es muy escueto en la memoria descriptiva, apenas especifica detalles en el método de obtención, tampoco precisa las posibles formas galénicas y, en consecuencia, menos señala sobre sus usos o su forma de aplicación.

Ramón de Montaner centró sus trabajos en la obtención de derivados yodados de las sulfamidas, productos que presentan un alto valor terapéutico; sus primeros procedimientos registrados, inscritos entre marzo de 1943 y enero de 1944, comienzan combinando para-amino-fenil-sulfamida con derivados yodados que tenían el grupo amino o fenol con uno o varios átomos de yodo en una cadena abierta (serie alifática) o bien con átomos de yodo introducidos en un grupo bencénico, naftalénico, pirimidínico, tiazólico o similares; mediante esta asociación se consigue la sustitución de un hidrógeno del grupo sulfamídico, o los hidrógenos del grupo amino, por un radical yodado, con lo cual se incorpora el yodo al grupo sulfamídico (AHOEPM, patentes 161.055; 164.635). El autor explica la obtención del derivado yodo-anilina, que es incorporado a un núcleo sulfamídico empleando preferentemente para-acetil-amino-sulfocloruro; el producto obtenido es amino-fenol-sulfamido-benceno, del cual derivan una serie de compuestos basados en esta incorporación de derivados yodados al grupo sulfamídico. Ampliando su trabajo sobre derivados yodados de las sulfamidas, en abril de 1950 presentó a registro un nuevo procedimiento en el que sometió yodo-sulfamida, en solución ácida, a un tratamiento con anhídrido ftálico, también en solución ácida, obteniendo el derivado ftálico de la para-amino-fenil-sulfamido-yodo-benceno, producto que, al presentar una baja absorción por los tejidos, conserva una mayor concentración durante su circulación por el aparato digestivo. Estas combinaciones de yodo y sulfamida resultan activas contra los protozoos (AHOEPM, patente 192.849).

Dos investigadores catalanes, Coloma Giral Domenech y Rogelio Boix Güell, trabajaron, en la segunda mitad de la década de 1940, sobre sulfamidas benzoicas. Coloma Giral Domenech presentó, en octubre de 1947, un nuevo procedimiento para la fabricación de orto-toluol-sulfamida, necesaria en la obtención del ácido orto-sulfamido-benzoico (AHOEPM, patente 179.972); por su parte, Rogelio Boix Güell presentó a registro, en enero de 1948, un procedimiento para la obtención de sulfamida benzoica perfeccionando el antiguo método de Heyden, la propuesta alemana de uso habitual en la época (AHOEPM, patente 182.320). Ninguna de estas dos patentes parecen tener continuidad en el tiempo; tampoco es ésta una línea que interese a otras empresas extranjeras.

La *Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas* S.A. presentó a registro, en junio de 1955, un procedimiento para abreviar la síntesis de 5-R-amino-1,3,4-tiadiazol-2-tiol, una molécula que sirve para la preparación de 3,4-tiadiazol-2-sulfamida (AHOEPM, patente 222.209). Esta misma empresa registró, en enero de 1959, un procedimiento para la obtención de sulfamidas del tipo metoxi-piridazina (AHOEPM, patente 246.746). Ninguna de estas dos patentes tuvo, hasta donde sabemos, continuidad como línea de trabajo; tampoco parecen corresponder con investigaciones desarrolladas por otras empresas del sector.

Jesús Camón Cano [*Laboratorio Argenol*], interesado en la fabricación de productos derivados de la plata que, por sus propiedades bactericidas, tienen gran aplicación terapéutica, propuso, en octubre de 1960, la acción sinérgica de los preparados argénticos con las sulfamidas; no en vano la plata coloidal, obtenida por electrolisis de plata pura y agua destilada, se ha considerado uno de los más potentes y eficaces germicidas, prácticamente no tiene efectos secundarios a dosis adecuadas, no interacciona con otros medicamentos y no provoca reacciones de rechazo ni alérgicas; no obstante se puede acumular en el interior de los tejidos, produciendo argirosis. Su patente intenta probar, mediante trabajos experimentales, la eficacia curativa y la falta de toxicidad de su compuesto de absorción: caolín plateado coloidal (AHOEPM, patente 262.752). Tampoco esta propuesta parece tener continuidad.

Algo más de éxito pudo tener la propuesta de asociar sulfamidas con otros antibióticos, particularmente con tetraciclinas; *Antonio Gallardo S.A.*, una empresa domiciliada en Barcelona, presenta uno de estos procedimientos en mayo de 1963 (AHOEPM patente 282.689).

Anotar, por último, el procedimiento de obtención de una sulfamida insoluble, registrado en julio de 1951 por Juan Martí Camp y José Alberti Gubert, del que nada podemos decir al no haber llegado hasta nosotros su memoria técnica (AHOEPM, patente 198.785).

Las empresas españolas con patentes de sulfamidas (1936-1963)		
<i>Antonio Esteve Subirana</i> [Manresa, Barcelona]		
1938. 29-IV	144.173	Procedimiento para la preparación de la para-amino-fenil-sulfamida.
<i>José Andreu Miralles y Juan Andreu Miralles</i> [Barcelona]		
1940. 19-II	149.121	Perfeccionamiento de la obtención de la p-amino-benceno-sulfamida.
<i>Clemente Sierra</i> [Bilbao]		
1941. 20-XII	155.394	Procedimiento de obtención de amino-benzol-sulfamidas.
<i>Instituto Farmacológico Latino S.L.</i> [Madrid]		
1942. 22-I	155.966	Procedimiento para obtener la reacción entre sulfo-halogenuros amino-bencénicos y aminas primarias sustituidas, aplicable a la preparación de las sustancias medicinales llamadas vulgarmente sulfamidas.
<i>Jacinto Megías Fernández</i> [Madrid]		
1942. 17-IV	156.752	Procedimiento de obtención de derivados di-bromados en el núcleo de la sulfamida.
<i>Ramón de Montaner Giraudier</i> [Barcelona]		
1943. 12-III	161.055	Procedimiento para la obtención de nuevos productos derivados de las sulfamidas.
1944. 22-I	164.635	Mejoras en el procedimiento de obtención de nuevos productos derivados de las sulfamidas, objeto de la patente principal número 161.055.
1950. 25-IV	192.849	Procedimiento para la obtención de derivados ftálicos de la mono-yodo-sulfamida.

Coloma Giralt Domènech [Badalona, Barcelona]		
1947. 2-X	179.972	Un nuevo procedimiento para la fabricación de orto-toluidina sulfamida, necesaria en la obtención del ácido orto-sulfamido-benzoico.
Rogelio Boix Güell [Manresa, Barcelona]		
1948. 29-I	182.320	Un nuevo procedimiento para la obtención de sulfamida benzoica.
Juan Martí Camp y José Alberti Gubern [España, s/l]		
1951. 7-VII	198.785	Procedimiento de obtención de una sulfamida insoluble.
Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A. [Barcelona]		
1955. 3-VI	222.209	Un procedimiento para la obtención de sulfamidas.
1959. 24-I	246.746	Un perfeccionamiento en el procedimiento de preparación de una sulfamida.
Laboratorio Martín Cuatrecasas S.A. [Barcelona]		
1956. 16-VI	229.154	Nuevo método de preparación de sulfamidas.
Jesús Camón Cano [Zaragoza]		
1960. 25-X	262.752	Procedimiento para suprimir la toxicidad de las penicilinas por vía digestiva por medio de los efectos sinérgicos de su asociación con un tipo especial de coloide de plata.
Antonio Gallardo S.A. [Barcelona]		
1962. 21-XI	282.689	Procedimiento para la preparación de sulfamidas con tetraciclina o sus derivados.

1.3.2. Las empresas extranjeras

1.3.2.a. Alemania

Las empresas alemanas, con sus ocho expedientes de patentes relacionadas con sulfamidas, constituyen -junto con las suizas- uno de los bloques que mayor presencia tuvo en el registro de estos productos en España. Una parte de sus expedientes se registran con anterioridad a la finalización de la Segunda Guerra Mundial, sólo unas pocas empresas volvieron a mostrar su interés en los comienzos de la década de 1960; las trataremos por separado.

En febrero de 1939 la empresa berlinesa *Schering A.G.* presentó a registro patentes de sulfamidas sustituidas en el grupo amino, utilizadas como intermedios en la preparación de otros productos farmacéuticos (AHOEPM, patente 146.561); en años posteriores presenta dos certificados de adición a esta patente principal, registrados en enero de 1941 (AHOEPM patente 151.608) y julio de 1943 (AHOEPM patente 162.528).

Bajo la marca *I.G. Farbenindustrie* se registró, en enero de 1940, un procedimiento destinado a la obtención de una amino-benzol-sulfamida (AHOEPM 147.802), quizás debido a técnicos vinculados con la empresa *Deutsche Hydrierwerke A.G.* quien se ocupó, en los comienzos de la década de 1940, de este tipo de derivados; sus resultados se concretan, en lo que a España atañe, en dos patentes muy similares, presentadas en abril de 1942, en las que se recogen sendos procedimientos ya patentados ante la Administración alemana (AHOEPM, patentes 156.775 y 156.950).

Los derivados amino-benzólicos obtenidos según estos procedimientos son, de acuerdo con sus autores, sustancias solubles, de gran eficacia químico-terapéutica para combatir infecciones bacterianas, esencialmente las producidas por estreptococos, gonococos o neumococos y las infecciones de gangrena gaseosa tanto en hombre como en otros animales.

Las empresas alemanas con patentes de sulfamidas registradas en España (1936-1945)		
I.G. Farben [Frankfurt a. Main]		
1940. 16-I	147.802	Obtención de compuestos sulfamídicos.
Schering A.G. [Berlín]		
1939. 2-II	146.561	Procedimiento para la obtención de derivados de las sulfamidas.
1941. 30-I	151.608	Certificado de adición a la patente 146.561.
1943. 29-VII	162.528	Segundo certificado de adición a la patente 146.561.
Deutsche Hydrierwerke A.G. [Rodleben]		
1942. 18-IV	156.775	Un procedimiento para obtener derivados de sulfamidas cíclicos.
1942. 30-IV	156.950	Un procedimiento para obtener derivados de sulfamidas cíclicos.

La empresa alemana *Chemische Fabrik von Heyden A.G.* mostró su interés por el mercado español en junio de 1961, presentó entonces a registro un procedimiento que permitía obtener sulfamidas del indol y de sus derivados, partiendo de 2,3-dihidroindoles (indolina); en su propuesta se hace reaccionar la indolina con un halogenuro de un ácido sulfónico; estos compuestos se pueden transformar en combinaciones del indol, mediante deshidrogenación. Las combinaciones obtenidas por este procedimiento resultan útiles como productos intermedios en la fabricación de medicamentos antidiabéticos (AHOEPM, patente 268.685).

En octubre de 1963 la alemana *Schering A.G.* presentó a registro un procedimiento para la obtención de sulfamidas pirimidínicas diseñadas para reducir la glucemia, en el que se mejoraba el proceso generalmente aceptado pues, los compuestos obtenidos por esta patente alemana poseen, de acuerdo con sus creadores, un efecto adicional retardado (AHOEPM, patente 292.294).

Las empresas alemanas con patentes de sulfamidas registradas en España (1961-1963)		
Chemische Fabrik von Heyden A.G. [Múnich, Alemania]		
1961. 28-VI	268.685	Un procedimiento para la fabricación de halogenuros del ácido sulfónico y sulfamidas del indol y de sus derivados.
Schering A.G. [Berlín]		
1963. 8-X	292.294	Procedimiento para la fabricación de nuevas sulfamidas de acción prolongada reductoras de la glucemia.

1.3.2.b. Suiza

La compañía suiza *Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel* centró sus esfuerzos, al menos en lo que el registro español recoge, en las sulfamidas sustituidas en el grupo amino; se interesó por obtener sulfamidas en las que un átomo del hidrógeno

del grupo amino está reemplazado por un radical heterociclo, que puede estar sustituido o no; sus propuestas, presentadas entre enero de 1941 y septiembre de 1942, estudian con preferencia aquellas sulfamidas cuyo sustituyente en el grupo amino es el tiazol, pues las sales cálcicas de estas sulfamidas tienen poco efecto toxico; introduce también sustituyentes en el núcleo de la sulfamida, con los cuales mejora las propiedades de los compuestos (AHOEPM patentes 151.403, 151.993 y 158.715).

Un procedimiento empleando colorantes azoicos apropiados para preparar derivados de las sulfamidas fue registrado, en marzo de 1957, por la empresa suiza *F. Hoffmann-La Roche & Cie. S.A.*, en él se desarrolla un método para obtener 5-sulfanil-amino-3,4-dimetil-isoxazol, mediante reducción, en medio fuertemente ácido, del compuesto azoico: p,p'-bis-[(3,4-dimetil-isoxazolil-5)-amino-sulfonil]-azo-benceno (AHOEPM, patente 233.958). Esta misma empresa suiza registró, en el febrero de 1961, un mecanismo de fabricación de sulfamidas con alteraciones en el grupo pirimidínico, cuyos resultados resultaron especialmente útiles contra estafilococos, neumococos y colibacilos (AHOEPM, patente 264.827).

Ciba S.A. registró, en noviembre de 1958, un procedimiento para obtener derivados de amino-benzol-sulfamidas que poseen la agrupación estructural C-N'-SO-N''-R, en la que se observa la máxima proximidad ente el nitrógeno N' del grupo amino y el nitrógeno N'' del grupo sulfamido; las distintas acciones que ejercen los productos de las sulfamidas de este grupo dependen de los diferentes sustituyentes sobre estos nitrógenos (AHOEPM, patente 245.281).

En mayo de 1961 la empresa *Sandoz A.G.* presentó a registro un procedimiento relacionado con la preparación de ésteres del ácido 3-sulfamil-4-halógeno-benzoico (AHOEPM, patente 267.411); los compuestos obtenidos por este procedimiento, que a temperatura ambiente son cristalinos, presentan propiedades diuréticas, natriuréticas y saluréticas. Pocos meses después, en diciembre de 1961, la misma empresa registró un procedimiento complementario del anterior y cuyos compuestos resultantes mantienen sus propiedades diuréticas (AHOEPM, patente 273.136).

Las empresas suizas con patentes de sulfamidas registradas en España (1936-1963)		
<i>Gesellschaft Chemische Industrie in Basel</i> [Basilea]		
1941. 8-I	151.403	Procedimiento para la obtención de nuevas sales derivadas de benzosulfamida.
1941. 28-II	151.993	Procedimiento para la obtención de nuevos derivados de benzosulfamida.
1942. 25-IX	158.715	Procedimiento para la obtención de derivados de p-amino-benzol-sulfamidas.
<i>F. Hofmann-La Roche & Cie. S.A.</i> [Basilea]		
1957. 1-III	233.958	Procedimiento para la preparación de una sulfamida de la serie de los isoxazoles.
1961. 11-II	264.827	Procedimiento para la fabricación de sulfamidas del grupo pirimidínico.
<i>Ciba S.A.</i> [Basilea]		
1958. 13-XI	245.281	Procedimiento para la obtención de nuevas sulfamidas.

Sandoz A.G. [Basilea]		
1961. 16-V	267.411	Procedimiento de obtención de nuevas sulfamidas.
1961. 21-XII	273.136	Procedimiento para la obtención de nuevas sulfamidas.

1.3.2.c. Los Estados Unidos de Norteamérica

Bajo licencia norteamericana, *Hoffmann-La Roche* Inc. presentó en el registro español, en enero de 1946, un procedimiento para obtener derivados de sulfamidas caracterizados por la presencia en su molécula de un anillo heterocíclico (como la pirimidina) en posición N¹ y de un resto acíclico alifático sustituido por un grupo de nitrógeno cuaternario en posición N⁴; los productos iniciales para la preparación de las nuevas combinaciones son derivados N⁴-halógenos-acíclicos de sulfa-combinaciones que contienen, en la posición N¹ de la combinación de sulfamida, un anillo heterocíclico, como por ejemplo 2,-N⁴-cloro-acetil-sulfamido-pirimidina (AHOEPM, patente 172.048). Estas combinaciones son muy solubles en agua y reabsorbidas muy lenta o incompletamente en el tubo intestinal, por lo que originan niveles muy bajos en sangre después de su administración oral, lo que evita complicaciones renales; además presentan baja toxicidad.

La norteamericana *Merck & Co.* Inc. protegió en España, en noviembre de 1958, un procedimiento para la obtención de derivados de 2,4-disulfamil-anilinas, con una estructura química en la cual son adyacentes la función sulfamido y un halógeno (AHOEPM, patente 245.390). Los derivados de 2,4-disulfamil-anilinas obtenidos por la empresa *Merck & Co.* presentan propiedades diuréticas, natriuréticas y/o saluréticas; son productos intermedios en la preparación de los compuestos de 1,1-dióxido de 1,2,4-benzo-tiadiacina-sulfamil-sustituídos, igualmente dotados de propiedades diuréticas; pueden ser administrados por vía oral, en forma de tabletas, cápsulas o en otras formas análogas; resultan útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y otras anormalidades que provocan un estado edematoso en el organismo por retención anormal de sodio.

Las empresas norteamericanas con patentes de sulfamidas registradas en España (1936-1963)		
<i>Hoffmann-La Roche, Inc.</i> [Nutley]		
1946. 5-I	172.048	Un procedimiento para preparar derivados de la sulfamida solubles en agua
<i>Merck & Co.</i> [Rahway. New Jersey]		
1958. 6-XI	245.390	Procedimiento para preparar compuestos de sulfamidas.

1.3.2.d. Bélgica

Sólo una empresa belga, *Société Carbochimique* S.A., mostrará interés por patentar, en España, sus procedimientos relacionados con las sulfamidas; y éstos no tendrán utilidad terapéutica, sino que se vinculan a la obtención de colorantes textiles.

Una primera patente, presentada el 21 de diciembre de 1960, usa compuestos monoazoicos sulfamidados, y sus complejos de cromo y cobalto, de forma que un metal está asociado a dos moléculas del compuesto azoico, iguales o diferentes, pero al menos una de ellas es una función sulfamídica que tiene la estructura: -SO₂N-[alquil]-C₂-H₄-

CN y presenta, sobre cada uno de los dos átomos de carbón, en posición 'orto' con relación al grupo azoico, un grupo metalizable o un grupo capaz de transformarse en él. Estos colorantes tiñen las fibras polipeptídicas naturales, como la lana y el cuero y son resistentes a la luz (AHOEPM, patente 263.469). Esta misma empresa suiza presentó, en el registro español de patentes, este mismo 21 de diciembre, una mejora al procedimiento anterior, al usar compuestos monoazoicos para la preparación de colorantes que poseen, una o varias veces, la función sulfamídica terciaria de fórmula: $-\text{SO}_2-\text{N}[\text{alquil}]-\text{C}_2\text{H}_4-\text{COOH}$, en la que, como puede observarse, el grupo -CN de la función sulfamídica de la patente anterior se ha sustituido por el grupo -COOH; este grupo carboxilo hace que estos compuestos sean muy solubles en agua, teniendo al mismo tiempo buena afinidad para las fibras polipeptídicas a las que tiñen a pH 4,5 (AHOEPM, patente 263.470).

Las empresas belgas con patentes de sulfamidas registradas en España (1936-1963)		
Société Carbochimique S.A. [Bruselas]		
1960. 21-XII	263.469	Procedimiento para la preparación de nuevos colorantes sulfamidados.
1960. 21-XII	263.470	Procedimiento para la preparación de nuevos colorantes sulfamidados.

1.3.3. La tramitación de las solicitudes de patentes: tiempo y publicidad

1.3.3.a. El período de tramitación

La tabla que sigue a estas líneas muestra, en días, el tiempo que tardó cada una de las patentes analizadas en ser aprobada, desde el momento de su presentación, y en ser publicada la autorización.

Tiempo de tramitación de las patentes de sulfamidas presentadas ante el registro español de patentes (1938-1963)					
Patente	Tipo	Solicitud	Concesión	Publicación	Solicitante
144.173	Introducción	1938. 29-IV	1938. 31-XII. 246 días	1939. 1-I 1 día	<i>Antonio Esteve Subirana</i> [Manresa, Barcelona]
146.561	Invención	1939. 2-II	1939. 11-X 251 días	1941. 1-III 507 días	<i>Schering A.G.</i> [Alemania]
147.802	Invención	1940. 16-I	1941. 13-III 422 días	1941. 16-IX 87 días	<i>I.G. Farben</i> [Alemania]
149.121	Invención	1940. 19-II	1941. 8-X 597 días	1942. 1-V 205 días	<i>José Andreu Miralles y</i> <i>Juan Andreu Miralles</i> [Barcelona]
151.608	Certificado de adición	1941. 30-I	1942. 28-V 483 días	1943. 1-III 276 días	<i>Schering A.G.</i> [Alemania]
151.403	Invención	1941. 8-I	1942. 20-V 478 días	1943. 1-III 284 días	<i>Gesellschaft Chemische</i> <i>Industrie in Basel</i> [Suiza]
151.993	Invención	1941. 28-II	1942. 12-VI 469 días	1943. 1-III 262 días	<i>Gesellschaft Chemische</i> <i>Industrie in Basel</i> [Suiza]
155.394	Invención	1941. 20-XII	1942. 20-X 303 días	1943. 1-III 141 días	<i>Clemente Sierra</i> [Bilbao]
156.950	Invención	1942. 30-IV	1943. 8-III 312 días	1943. 1-IV 24 días	<i>Deutsche Hydrierwerke</i> <i>A.G. [Alemania]</i>

155.966	Invención	1942. 22-I	1943. 11-I 354 días	1943. 1-IV 80 días	<i>Instituto Farmacológico Latino S.L. [Madrid]</i>
156.752	Invención	1942. 17-IV	1943. 9-II 298 días	1943. 1-IV 51 días	<i>Jacinto Megias Fernández [Madrid]</i>
156.775	Invención	1942. 18-IV	1943. 9-II 297 días	1943. 1-IV 51 días	<i>Deutsche Hydrierwerke A.G. [Alemania]</i>
158.715	Invención	1942. 25-IX	1943. 25-III 181 días	1943. 1-IV 6 días	<i>Gesellschaft Chemische Industrie in Basel [Suiza]</i>
161.055	Invención	1943. 12-III	1943. 19-V 68 días	1943. 1-IX 105 días	<i>Ramón de Montaner Giraudier [Barcelona]</i>
162.528	Certificado de adición	1943. 29-VII	1943. 30-VII 1 día	1944. 1-III 215 días	<i>Schering A.G. [Alemania]</i>
164.635	Invención	1944. 22-I	1944. 13-II 22 días	1944. 16-II 3 días	<i>Ramón de Montaner Giraudier [Barcelona]</i>
172.048	Invención	1946. 5-I	1946. 5-IX 243 días	1946. 1-X 26 días	<i>Hoffmann-La Roche Inc. [EE. UU.]</i>
179.972	Invención	1947. 2-X	1947. 3-X 1 día	1947. 16-XI 44 días	<i>Coloma Giralt Domènech [Badalona, Barcelona]</i>
182.320	Invención	1948. 29-I	1948. 13-II 15 días	1948. 1-IV 48 días	<i>Rogelio Boix Güell [Manresa, Barcelona]</i>
192.849	Invención	1950. 25-IV	1951. 24-I 274 días	1951. 16-II 23 días	<i>Ramón de Montaner Giraudier [Barcelona]</i>
198.785	Introducción	1951. 7-VII	1951. 9-XI 125 días	1951. 16-XII 37 días	<i>Juan Martí Camp y José Alberti Gubern [Barcelona]</i>
222.209	Invención	1955. 3-VI	1955. 25-X 144 días	1955. 1-XII 36 días	<i>Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A. [Barcelona]</i>
229.154	Invención	1956. 16-VI	1956. 7-VII 21 días	1956. 1-X 96 días	<i>Laboratorio Martín Cuatrecasas S.A. [Barcelona]</i>
233.958	Invención	1957. 1-III	1957. 2-VII 122 días	1957. 16-X 106 días	<i>F. Hofmann-La Roche & Cie. S.A. [Suiza]</i>
245.281	Invención	1958. 13-XI	1959. 30-III 137 días	1959. 1-VI 63 días	<i>Ciba S.A. [Suiza]</i>
245.390	Invención	1958. 6-XI	1958. 24-XI 18 días	1959. 1-V 173 días	<i>Merck & Co. [EE. UU.]</i>
246.746	Invención	1959. 24-I	1959. 10-II 17 días	1959. 16-V 95 días	<i>Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A. [Barcelona]</i>
263.469	Invención	1960. 21-XII	1961. 3-I 13 días	1961. 1-III 57 días	<i>Société Carbochimique S.A. [Bélgica]</i>
263.470	Invención	1960. 21-XII	1961. 3-I 13 días	1961. 1-III 57 días	<i>Société Carbochimique S.A. [Bélgica]</i>
262.752	Invención	1960. 25-X	1960. 5-XII 40 días	1961. 16-IV 132 días	<i>Jesús Camón Cano [Zaragoza]</i>
264.827	Invención	1961. 11-II	1961. 20-V 68 días	1961. 1-VIII 103 días	<i>Hofmann-La Roche & Cie. S.A. [Suiza]</i>
267.411	Invención	1961. 16-V	1961. 25-IX 132 días	1961. 16-XI 52 días	<i>Sandoz A.G. [Suiza]</i>
268.685	Invención	1961. 28-VI	1961. 17-X 111 días	1961. 16-XII 60 días	<i>Chemische Fabrik von Heyden A.G. [Alemania]</i>
273.136	Invención	1961. 21-XII	1962. 17-V 147 días	1962. 1-VII 45 días	<i>Sandoz A.G. [Suiza]</i>

282.689	Invención	1962. 21-XI	1963. 25-I 65 días	1961. 16-V 101 días	Antonio Gallardo S.A. [Barcelona]
292.294	Invención	1963. 8-X	1963. 21-X 13 días	1964. 1-I 71 días	Schering A.G. [Alemania]

Los datos, ordenados por quinquenios, y segregando del conjunto las patentes promovidas por empresas españolas y extranjeras se indican en las tablas que siguen:

Promedio de tiempo de tramitación de las patentes de sulfamidas presentadas ante el registro español de patentes (1936-1963)				
Período	Patentes concedidas	Tiempo medio de concesión	Tiempo medio de publicación	Tiempo medio de tramitación
1938-1940	4	379,0 días	200,0 días	579,0 días
1941-1945	12	272,2 días	124,8 días	397,0 días
1946-1950	4	133,2 días	35,2 días	168,5 días
1951-1955	2	134,5 días	36,5 días	171,0 días
1956-1960	8	47,6 días	97,4 días	145,0 días
1961-1963	6	89,4 días	72,0 días	161,3 días
Total	36	180,6 días	103,4 días	284,0 días

Promedio de tiempo de tramitación de las patentes de sulfamidas presentadas ante el registro español de patentes por empresas españolas (1936-1963)				
Período	Patentes concedidas	Tiempo medio de concesión	Tiempo medio de publicación	Tiempo medio de tramitación
1938-1940	2	421,5 días	103,0 días	524,5 días
1941-1945	5	209,0 días	76,0 días	285,0 días
1946-1950	3	96,7 días	38,3 días	135,0 días
1951-1955	2	134,5 días	36,5 días	171,0 días
1956-1960	3	26,0 días	107,7 días	133,7 días
1961-1963	1	65,0 días	101,0 días	166,0 días
Total	16	161,9 días	74,9 días	236,8 días

Promedio de tiempo de tramitación de las patentes de sulfamidas presentadas ante el registro español de patentes por empresas extranjeras (1936-1963)				
Período	Patentes concedidas	Tiempo medio de concesión	Tiempo medio de publicación	Tiempo medio de tramitación
1938-1940	2	336,5 días	297,0 días	633,5 días
1941-1945	7	317,3 días	159,7 días	477,0 días
1946-1950	1	243,0 días	26,0 días	269,0 días
1951-1955	-	--	--	--
1956-1960	5	60,6 días	91,2 días	151,8 días
1961-1963	5	94,2 días	66,2 días	160,4 días
Total	20	195,6 días	126,2 días	321,8 días

Aunque el volumen de datos no sea alto, parece observarse una progresiva disminución en el tiempo transcurrido desde el final de la guerra civil hasta la segunda mitad de la década de 1940 en que, el tiempo de tramitación parece estabilizarse. Aun cuando, a partir de la segunda mitad de la década de 1950 parece ganarse tiempo en el trámite de concesión de la patente, la tardanza en hacer pública la concesión anula la pequeña ventaja que se gana en el trámite, quizás debido a una posible saturación en las páginas del *Boletín Oficial de la Propiedad Industrial*.

En cualquier caso, la tramitación de las patentes presentadas por empresas españolas parecen diligenciarse con mayor celeridad que las de autores extranjeros, y eso que la práctica totalidad de las foráneas hacían innecesaria su evaluación por venir avaladas por las patentes realizadas en otros países y ser obligado su registro por los acuerdos internacionales vigentes.

1.3.b. La publicidad de las patentes de sulfamidas registradas en España a través de la revista Ión

No son muchas las referencias a patentes de sulfamidas registradas en España de las que se hace eco la revista *Ión*, tan sólo siete: tres de ellas se corresponden a empresas españolas, otras tres son suizas y una más norteamericana.

Noticias sobre las patentes de sulfamidas publicadas por la revista <i>Ión</i> (1944-1964)			
Laboratorio	Patente	Publicación	Ión
Laboratorios Martín Cuatrecasas S.A. [Barcelona]	229.154	1956. 1-X	<i>Ión</i> , 17(190): 277. 1957 [V] 212 días
Ciba S.A. [Suiza]	245.281	1959. 1-VI	<i>Ión</i> , 20(228): 439. 1960 [VII] 355 días
Merck & Co. [EE.UU.]	245.390	1959. 1-V	<i>Ión</i> , 20(227): 374. 1960 [VI] 397 días
Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A. [Barcelona]	246.746	1959. 16-V	<i>Ión</i> , 20(229): 506. 1960 [VIII] 440 días
Hofmann-La Roche & Cie. S.A. [Suiza]	264.827	1961. 1-VIII	<i>Ión</i> , 22(255): 638. 1962 [X] 426 días
Sandoz A.G. [Suiza]	267.411	1961. 16-XI	<i>Ión</i> , 22(255): 639. 1962 [X] 319 días
Sandoz A.G. [Suiza]	273.136	1962. 1-VII	<i>Ión</i> , 22(262): 205. 1963 [V] 242 días
Antonio Gallardo S.A. [Barcelona]	282.689	1962. 21-XI	<i>Ión</i> , 24(279): 590. 1964 [X] 710 días

No parece que la prontitud sea una de las características que definen la actitud de los responsables de la revista *Ión* frente a las patentes de sulfamidas; en el caso de las españolas tardaron una media de 434,3 días –notablemente más de un año- en hacerlas públicas desde que tuvieran salida de la Oficina Española de Patentes; en algunos casos se informó de ellas pasados casi dos años. Las patentes extranjeras corrieron igual suerte, una media de 346 días –prácticamente el año-.

En cualquier caso, y aunque disponemos de muy pocos datos para elevar a fiables estos resultados, todo parece indicar que desde que una patente de sulfamida fuera hecha pública en el *Boletín Oficial de la Propiedad Industrial* hasta que recibiera publicidad desde las páginas de *Ión*, media aproximadamente un año. Los criterios por los que los editores de *Ión* incorporarn unas u otras patentes no quedan claros.

2. LAS PATENTES DE PENICILINAS EN ESPAÑA (1936-1942)

2.1. Introducción

Alexander Fleming (1881-1955) puso de manifiesto, en 1929, que *Penicillium notatum* inhibía el crecimiento de cultivos de *Staphylococcus*, sin observar toxicidad en su uso tras ser aplicado en ratones y conejos¹³⁶. No obstante, la utilización de este producto antibacteriano no tuvo amplia repercusión durante la siguiente década, en pleno apogeo de las terapias con sulfamidas sintéticas¹³⁷.

Habría que esperar hasta el agosto de 1940 para que un equipo de la *School of Pathology* de la Universidad de Oxford, dirigido por Ernst Boris Chain (1906-1979) y Howard Walter Florey (1898-1968) diera luz pública a sus estudios sobre una forma pura de penicilina, de utilidad terapéutica contra las infecciones estreptocócicas en ratones, por vía subcutánea¹³⁸; en febrero de 1941 el ‘grupo de Oxford’ dispuso de suficiente penicilina para abordar un caso clínico, lamentablemente sin éxito pese a los esperanzadores inicios del tratamiento; sus ensayos siguieron durante los meses posteriores y, en agosto de éste 1941 estuvieron en condiciones de publicar un artículo con los primeros diez casos positivos observados¹³⁹.

No fueron los únicos en intentarlo, un equipo de la Universidad de Columbia, integrado por Martin Henry Dawson, Gladys I. Hobby, Kart Meyer y Eleanor Chaffee presentaron, en el congreso anual de la *American Society for Clinical Investigation*, celebrado en mayo de 1941, en Atlantic City¹⁴⁰, los primeros resultados obtenidos tras

¹³⁶ Alexander FLEMING. “On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae”. *British Journal of Experimental Pathology*, 10: 226-236. Londres, 1929. Sobre el descubrimiento de la penicilina hay disponible una ingente bibliografía; cf., entre otros, Ronald HARE. *The birth of penicillin and the disarming of microbes*. Londres: Allen & Unwin, 1970; David L. COWEN, Alvin B. SEGELMAN. *Antibiotics in historical perspective*. [S.l.]: Merck Sharp & Dohme International, 1981; Ana Leonor PEREIRA y João RUI PITA. “Alexander Fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945)”. *Revista da Faculdade de Letras. História*, III série, 6: 129-151. Coimbra, 2005; Abby KLAUS. “Penicillin: ‘the miracle drug’”. *Illinois History*, 59: 19-22. Chicago, 2006; Robert BUD. *Penicillin: triumph and tragedy*. Nueva York: Oxford University Press, 2007; Jessica Christine LAI. “Penicillins: their chemical history and legal disputes in New Zealand”. *Chemistry in New Zealand*, 73(3): 116-124. Christchurch, 2009.

¹³⁷ Alexander Fleming llegó a aplicar filtrados del cultivo como agente terapéutico en algunos procesos infecciosos, como sinusitis o conjuntivitis, con cierto éxito. No obstante el desconocimiento sobre el propio producto, su inestabilidad y la dificultad que entrañaba su aislamiento fueron razones más que sobradas para que no diera continuidad a estos estudios (cf. Ronald HARE, “New light on the history of penicillin”. *Medical History*, 26: 1-24. Londres, 1982; José SEGARRA DOMÉNECH. “De antibiosis a antibioticoterapia: una realidad farmacoecológica”. *Llull*, 20(38): 311-332, Zaragoza, 1997). También Cecil G. Paine (1905-1994), discípulo de Fleming, utilizó, en Sheffield, entre 1930 y 1931, un filtrado penicilínico para tratar algunos casos de infecciones oculares (H. T. SWAN. “C. G. Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy”. *Medical History*, 30: 42-46. Londres, 1986).

¹³⁸ Ernst Boris CHAIN, Howard Walter FLOREY, Arthur D. GARDNER, Norman G. HEATLEY, Margaret A. JENNINGS, Jena ORR-EWING, A.G. SANDERS. “Penicillin as a chemotherapeutic agent”. *The Lancet* 236: 226-228. Londres, 1940.

¹³⁹ Edward ABRAHAM, Ernst Boris CHAIN, C.M. FLETCHER, A.D. GARDNER, N.G. HEATLEY, M.A. JENNINGS, Howard Walter FLOREY. “Further observations on penicillin”. *The Lancet*, 238: 177-189. Londres, 1941.

¹⁴⁰ Martin Henry DAWSON, Gladys I. HOBBY, Kart MEYER, Eleanor CHAFFEE. “Penicillin as a chemotherapeutic agent”. En: “Proceedings of the thirty-third annual meeting of the American Society for

tratar a una docena de pacientes con endocarditis subcutáneas en el *Presbyterian Hospital* de la Universidad de Columbia, sus resultados no fueron lo exitoso que cabría esperar, sin duda por no disponer de la cantidad de penicilina deseada, no obstante los enfermos no mostraron efectos tóxicos frente a este tratamiento¹⁴¹.

La penicilina se presentaba como una útil herramienta terapéutica, pero su producción distaba de ser asequible; pese a sus intentos, el ‘grupo de Oxford’ no logró encontrar en la Gran Bretaña de los comienzos de 1940 los medios suficientes para obtener el antibiótico a gran escala y a un precio razonable¹⁴².

En julio de 1941, Howard Florey y Norman G. Heatley (1911-2004), miembros del equipo de la Universidad de Oxford, trasladaron sus programas de investigación a las instalaciones del *Northern Research Laboratory*, en Peoria (Illinois, EE. UU.), un centro de investigación fundado apenas hacía unos años por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), vinculado al *National Center for Agricultural Utilization Research* (NCAUR) y dedicado a buscar soluciones alternativas a los excedentes agrícolas, pero que contaba ya con amplia experiencia en el trabajo en procesos fermentativos. Howard Florey regresó a Oxford en septiembre; Norman G. Heatley permaneció hasta diciembre de éste 1941 trabajando con el microbiólogo Andrew Jackson Moyer (1881-1959), sus estudios condujeron a señalar la idoneidad del ‘corn steep liquor’, un subproducto de la molienda del maíz, como el sustrato idóneo para el crecimiento industrial de estos hongos y la conveniencia de adicionar lactosa, en lugar de glucosa, en el medio de cultivo. Mas no sólo se estableció el que habría de ser el caldo de cultivo adecuado; se analizaron diversas cepas de hongos hasta encontrar el productor capaz de lograr más altos rendimientos de penicilina; resultó ser un *Penicillium chrysogenum* encontrado en un melón, el cual pudo ser ‘mejorado’ en sus cepas mutantes obtenidas tras ser ‘bombardeado’ con rayos X y ultravioletas. Con estos nuevos procedimientos, lograron obtenerse resultados admirables: hasta 1.000 unidades de penicilina/mililitro¹⁴³.

Clinical Investigation held in Atlantic City, N. J., May 5, 1941”. *The Journal of Clinical Investigation*, 20(4): 434. Nueva York, 1941.

¹⁴¹ Charles M. GROSSMAN (“The first use of penicillin in the United States”. *Annals of Internal Medicine*, 15(149): 135-136. Philadelphia, 2008), no menciona estos ensayos en su artículo, lo que fue objeto de crítica por Andrés G. ORTIZ (“The first use of penicillin in the United States [Letter]”. *Annals of Internal Medicine*, 15(150): 145. Philadelphia, 2008), Jesse J. WAGGONER (“The first use of penicillin in the United States [Letter]”. *Annals of Internal Medicine*, 15(150): 145-146. Philadelphia, 2008) y Eric A. JACKSON (“The first use of penicillin in the United States [Letter]”. *Annals of Internal Medicine*, 15(159): 146. Philadelphia, 2008); como reconoce el propio autor, “Perhaps my contribution should have been titled ‘The First Successful Use of Penicillin in the United States’ (Charles M. GROSSMAN. “The first use of penicillin in the United States [Letter]”. *Annals of Internal Medicine*, 20(150): 145-146. Philadelphia, 2009).

¹⁴² Sobre la incidencia de los trabajos del grupo de la Universidad de Oxford cf. Trevor I. WILLIAMS. *Howard Florey: Penicillin and after*. Nueva York: Oxford University Press, 1984. Se ha discutido, en numerosas ocasiones, sobre la actitud del ‘grupo de Oxford’ frente a la patentabilidad de sus descubrimientos; conviene recordar, una vez más, que en 1941 los compuestos no podían ser patentados, por si mismos, en la mayoría de los países y los procesos de fabricación y extracción empleados tampoco constituían una novedad.

¹⁴³ La ‘unidad’ de penicilina queda definida como la cantidad de penicilina presente en una solución capaz de producir la inhibición del crecimiento de una colonia estafilocócica en 25 mm. alrededor del tubo en que esta solución está integrada; es el equivalente a 0,0006 mg. de penicilina G sódica pura (cf. David L. COWEN, Alvin B. SEGELMAN. *Antibiotics in historical perspective*. [S.l.]: Merck Sharp & Dohme International, 1981, pág. 155).

Normon G. Heatley no encontró, en su trabajo con Andrew J. Moyer, el espíritu de colaboración que esperaba y pasó a prestar sus servicios en la *Merck & Co. Inc.* (Rahway, New Jersey); en julio de 1942 regresó a Oxford. No ha de extrañar su vinculación a la farmacéutica americana; tras el desarrollo industrial de los procesos de fermentación sumergida, las empresas estadounidenses comenzaron una frenética carrera por producir este nuevo producto¹⁴⁴. En marzo de 1942 tuvo lugar el primer ensayo de esta penicilina de fabricación industrial, ocurrió en el *Yale-New Haven Hospital* de Connecticut; se utilizó, con éxito, material elaborado por la casa *Merck & Co.* Pronto los éxitos de esta nueva y ‘milagrosa’ droga¹⁴⁵ llegaron a la opinión pública a través de una inmensa campaña publicitaria global que llevó a que, en 1945, el Instituto Karolinska propusiera para el Nobel de Fisiología y Medicina, a Alexander Fleming, Ernst Boris Chain y Howard Walter Florey.

La II Guerra Mundial se convirtió en el mayor campo de estudio experimental para la penicilina; ya durante el segundo semestre de 1942 Robert Pulvertaft provó su utilidad para tratar infecciones provocadas por heridas de guerra en el *Fifteenth [Scottish] General Hospital* de El Cairo¹⁴⁶; él y otros muchos médicos emplearon caldos de penicilina de producción artesanal, un sistema que A.J. Hobson y L.D. Galloway denominaron ‘home-made penicillin’¹⁴⁷, muy alejado de los procesos industriales diseñados por el ‘equipo de Oxford’, y cuya calidad y pureza distaba mucho de los cánones requeridos para su comercialización; no obstante, fue ampliamente utilizado entre 1942 y 1945¹⁴⁸; no parece anecdótico que, por ejemplo, la *Hawaiian Planters' Record*, la publicación oficial de la *Hawaiian Sugar Planters' Association*, específicamente dedicada a temas relacionados con la producción industrial de azúcar, dedicara varios artículos, aparecidos en 1945, a valorar el interés de la producción del cultivo de penicilina entre los industriales azucareros¹⁴⁹; no muy distinta será la visión de algunos empresarios españoles dedicados al negocio de las destilerías.

Las penicilinas

Las penicilinas son metabolitos secundarios de *Penicillium chrysogenum* y entes semejantes; pero estos microorganismos pueden producir más de un tipo de penicilina. En un principio, las investigaciones se centraron en encontrar cepas altamente productoras de penicilinas; la fermentación de diferentes cepas de *Penicillium*

¹⁴⁴ De acuerdo con los datos proporcionados por David L. COWEN y Alvin B. SEGELMAN (cf. *supra*), en el primer semestre de 1943, la producción total de penicilina americana fue de 800 millones de unidades; en el segundo semestre la producción superó los 20 billones de unidades; en 1944 se alcanzaron los 1.663 billones de unidades y, en 1945, se produjeron 6.800 billones de unidades.

¹⁴⁵ La denominación fue ampliamente utilizada desde la segunda mitad de la década de 1940 (cf. David MASTERS. *Miracle drug*. Londres: Eyre & Spottiswoode, 1946).

¹⁴⁶ Robert J.V. PULVERTAFT. “Bacteriology of war wounds”. *The Lancet*, 242(6263): 1-2. Londres, 1943; IBID. “Local therapy of war wounds. 1. With Penicillin”. *The Lancet*, 242(6264): 341-346. Londres, 1943. Sus informes han sido estudiados por H. V. WYATT. “Robert Pulvertaft's use of crude penicillin in Cairo”. *Medical History*, 34: 320-326. Londres, 1990.

¹⁴⁷ A.J. HOBSON, L.D. GALLOWAY. “Home-made penicillin”. *The Lancet*, 243(6285): 230-231. Londres, 1944.

¹⁴⁸ Milton WAINWRIGHT. “The history of the therapeutic use of crude penicillin”. *Medical History*, 31: 41-56. Londres, 1987.

¹⁴⁹ Milton WAINWRIGHT. *Op. cit. ut supra*, cf. pág. 46.

chrysogenum condujo a la obtención de caldos de cultivo ricos en antibióticos, constituidos por una mezcla de penicilinas químicamente relacionadas. Desde los años centrales de la década de 1940, los trabajos realizados en el *Northern Regional Research Laboratory* de Peoria (Illinois, EE. UU.) habían puesto de manifiesto que la cantidad relativa de cada una de las penicilinas producidas estaba relacionada con la composición del medio de fermentación¹⁵⁰.

Tras la generalización de su producción y comercio, acabada la II Gran Guerra, los intereses de los investigadores se dirigieron hacia dos frentes: la búsqueda de nuevas penicilinas biosintéticas alternativas a la penicilina G -la penicilina obtenida de manera 'natural'- y la optimización del procedimiento de síntesis. En la primera línea de trabajo se logró la producción de nuevas penicilinas biosintéticas: penicilina O, penicilina S y, particularmente, la penicilina V, ampliamente utilizada gracias a su mayor estabilidad en medio ácido.

La penicilina G, habitualmente administrada en forma de sales de sodio y potasio, se muestra activa contra la práctica totalidad de las bacterias gram-positivo y algunas gram-negativo; no obstante presenta algunos inconvenientes: es inestable en medio ácido, lo que dificulta la administración del producto por vía oral; es rápidamente excretada, por lo que una acción continuada requiere de administración reiterada; es inefectiva contra la mayor parte de los gram-negativos y rápidamente inactivada por la acción de la penicilinasas. Cubrir estos cuatro frentes constituyó la mayor preocupación de los investigadores dedicados al estudio de este antibiótico.

El temprano descubrimiento, en 1940, de la inactivación de las penicilinas biosintéticas por una enzima bacteriana, la penicilinasas, que las transforma en ácido peniciloico¹⁵¹, unido a la masiva utilización terapéutica de penicilinas y a la rápida capacidad de las bacterias de generar resistencia a antibióticos, propició la proliferación de cepas bacterianas resistentes a la penicilina. Los trabajos del grupo de E.P. Abraham sobre la estructura de la penicilina, realizados en 1955, pusieron de manifiesto que la composición de la cadena lateral afectaba no sólo a la actividad antibacteriana de las penicilinas, sino también a su espectro de actuación¹⁵². Por ello, desde entonces, la mayor parte de las investigaciones sobre penicilinas se centraron en la síntesis química de esta molécula.

A finales de los años 1940, se supo que todas las penicilinas provenían de una estructura común: un anillo tiazolidínico (un anillo aminofenílico de los tiazoles) enlazado a un anillo β -lactámico a modo de cadena lateral; esta cadena podía ser alterada por la adición de distintos tipos de precursores, que incorporaban a ella nuevos grupos químicos. Este tipo de modificaciones tuvo cierto auge a lo largo de la década de 1950; sus primeros éxitos datan de 1953, con la obtención de la fenoxi-metil-penicilina (penicilina V), lograda al suministrar ácido fenoxi-acético al medio de fermentación. Esta nueva penicilina se muestra más estable frente a los ácidos gástricos que la

¹⁵⁰ Andrew J. MOYER, Robert D. COGHILL. "Penicillin: VIII. Production of penicillin in surface cultures". *Journal of Bacteriology*, 51(1): 57-78. Washington DC, 1946; IBID. "Penicillin X. The effect of phenylacetic acid on penicillin production". *Journal of Bacteriology*, 53(3): 329-341. Washington DC, 1947.

¹⁵¹ Edward ABRAHAM, Ernst Boris CHAIN. "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin". *Nature*, 146: 837. Londres, 1940.

¹⁵² Edward ABRAHAM, B.H. OLSON, G.G.F. NEWTON, D.M. SCHURMANS, J.R. SCHENCK, M.W. FISCHER, M.P. HARGIE, S.A. FUSARI. "Identity of cephalosporin N and synnematin B". *Nature*, 176: 551. Londres, 1955.

penicilina G, por lo que fue especialmente empleada para formas de administración oral; no obstante, su espectro antibiótico y su sensibilidad frente a la penicilina G son muy similares.

Durante la segunda mitad de la década de 1950 fueron muchos los productos desarrollados mediante estos procesos de biosíntesis, gran parte de ellos llevados a cabo por la compañía *Beecham*, en ocasiones en consorcio con la empresa *Bristol-Myers*, en otras con el apoyo de Ernst Chain, a la sazón director del *Istituto Superiore di Sanità*, en Roma. Pero ninguna de las penicilinas obtenidas por fermentación o por modificación química tuvieron una actividad antibiótica superior a la de las penicilinas G y V.

Fue precisamente un grupo de investigadores vinculados a los *Beecham Research Laboratories Ltd.*, Frank Ralph Batchelor, Frank Peter Doyle, John-Herbert-Charles Nayler y George Newbolt Rolinson quienes publicaron, en enero de 1959, el hallazgo del ácido 6-amino-penicilánico (6-APA), un producto acumulado en el medio de cultivo durante el proceso de fermentación de la penicilina¹⁵³; este ácido 6-amino-penicilánico (6-APA) es el compuesto químico que forma el núcleo fundamental de la molécula de penicilina. Tras su identificación se convirtió en la base para la obtención de compuestos sintéticos de las penicilinas; la adición de diferentes moléculas sobre el 6-amino-penicilánico determina la farmacología esencial y las propiedades antibacterianas de estos compuestos.

De manera paralela al descubrimiento del ácido 6-amino-penicilánico, en junio de 1959, John C. Sheehan y James P. Ferris, financiados por *Bristol Laboratories* y vinculados al *Massachusetts Institute of Technology*, propusieron otra exitosa vía para la síntesis de penicilina: escindir la cadena del radical acilo de una sal potásica de la penicilina G, dando origen así a un producto intermedio, convertible en nuevas penicilinas mediante la adición de distintas cadenas laterales¹⁵⁴. La reacción del 6-APA con cloruro de fenil-acético permitió obtener penicilina G; se lograba, mediante un proceso de acilación de la molécula inicial, introducir la cadena lateral deseada. Nacen así las penicilinas semisintéticas, unos productos que resultan más estables, ofrecen una fácil absorción y provocan menos efectos secundarios, además de convertirse en una solución a la resistencia adaptativa microbiana a los antibióticos.

La primera de las penicilinas semi-sintéticas en llegar al mercado fue la feneticilina, comercializada por *Beecham* bajo el nombre de *Broxil*; en 1960 hizo su entrada la potente meticilina, puesta en el mercado bajo el nombre de *Celbenin*, en un momento en que un buen número de cepas de estafilococos se habían convertido en resistentes a la penicilina; su eficacia resultó buena, en especial para bacterias resistentes a la penicilina G, pero su sensibilidad al ácido obligó a su empleo subcutáneo en lugar de por vía oral; en 1961 ya se dieron a conocer cepas meticilino-resistentes. La oxacilina hizo su aparición en los comienzos de 1960, con ella se inició un grupo de penicilinas isoxazólicas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina) que resultaron ser activas frente a la penicilinasa y mostraron un alto nivel de unión a las proteínas plasmáticas.

¹⁵³ Frank Ralph BATCHELOR, Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON. "Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations" *Nature*, 183: 257-258. Londres, 1959.

¹⁵⁴ John SHEEHAN, James P. FERRIS "The chemical conversion of penicillin G into a biologically active synthetic penicillin series". *Journal of the American Chemical Society*, 81(11): 2912. Washington DC, 1959.

El arsenal terapéutico de las penicilinas disponibles en los comienzos de la década de 1960 era suficientemente amplio, pero quedaba un flanco por cubrir: los patógenos gram-negativos; hacia ellos fueron dirigidas las investigaciones, en gran parte conducidas por técnicos vinculados al grupo *Beecham*. Pronto vio la luz la ampicilina, una penicilina que mostró actividad frente a las bacterias gram-negativo resistentes a la penicilina G, particularmente útil contra las enterobacterias como *Proteus* o *Salmonella*; fue puesta en el mercado bajo el nombre de *Penbritin* y ampliamente utilizada hasta que, en breve plazo, las bacterias gram-negativas mostraron sus cepas resistentes. En 1964 *Beecham* lanzó al mercado la amoxicilina, *Amoxil*, uno de los antibióticos de mayor éxito comercial debido a su alta capacidad de absorción, que permite su utilización en dosis más bajas, además de mostrar un rango de variación entre pacientes muy reducido¹⁵⁵. Amoxicilina, hetacilina, pivampicilina y epicilina, presentan un espectro de actuación similar.

De 1967 data una nueva penicilina semi-sintética, carbenicilina, una carboxipenicilina, también debida a los investigadores de *Beecham*, cuyo ámbito de actuación se extiende hacia las *Pseudomonas* y *Proteus* resistentes a la ampicilina; en el mercado llevó el nombre de *Pyopen* y su administración quedó circunscrita, al menos inicialmente, a la vía parenteral¹⁵⁶.

Este mismo grupo de *Beecham*, dirigido por Frank Ralph Batchelor, puso en evidencia, en junio de 1960, que el ácido 6-amino-penicilánico podría formarse a partir de las penicilinas hidrolizadas, mediante catálisis enzimáticas de otros microorganismos, *Streptomyces lavendulae* y *Escherichia coli*, entre ellos¹⁵⁷; por estas mismas fechas, C.A. Claridge y otros investigadores vinculados a los laboratorios *Bristol*, señalan la presencia de esta molécula, si bien de manera residual, en *Alcaligenes faecalis*, *Aerobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus lysodeikticus* y *Myobacteria phlei*, entre otros microorganismos¹⁵⁸.

En la década de 1950 se sugirió la posibilidad de que los inhibidores de la beta-lactamasa podrían aumentar la eficacia de la penicilina; pero hubo que esperar al hallazgo del ácido clavulánico, por parte de los investigadores del grupo *Beecham*, para disponer de una molécula que confirmara el aserto. El ácido clavulánico se emplea en conjunción con otras penicilinas, facilitando la entrada de éstas en la membrana plasmática; habitualmente se utiliza en asociación con amoxicilina, comercializado bajo el nombre de *Augmentine*; el producto presenta un amplio espectro de actividad, incluso contra bacterias resistentes a la penicilina, lo que le ha hecho ocupar grandes cuotas de mercado¹⁵⁹.

¹⁵⁵ Tony A.B. CORLEY. *Beechams, 1848-2000: From Pills to Pharmaceuticals*. Carnegie: Carnegie Publishing, 2011.

¹⁵⁶ E. T. KNUDSENT, George Newbolt ROLINSON, R. SUTHERLAND. "Carbenicillin: a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*". *British Medical Journal*, 3: 75-78. Londres, 1967.

¹⁵⁷ George Newbolt ROLINSON, Frank Ralph BATCHELOR, D. BUTTERWORTH, J. CAMERON-WOOD, M. COLE, G.C. EUSTACE, Marian V. HART, M. RICHARDS, E.B. CHAIN. "Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis". *Nature*, 187: 236-237. Londres, 1960.

¹⁵⁸ C.A. CLARIDGE, A. GOUREVITCH, J. LEIN. "Bacterial penicillin amidase". *Nature*, 187: 237-238. Londres, 1960.

¹⁵⁹ Obviamente no es el único, *Timentin* es una combinación de ticarcilina y clavulanato de potasio, de efectos similares. Sobre el desarrollo de estos antibióticos cf. George N. ROLINSON. "Forty years of β -lactam research". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 589-603. Londres, 1998.

2.2. Las patentes de penicilinas

En el período temporal que media entre marzo de 1945, momento en que se realizan los primeros registros de patentes relacionadas con penicilinas, y los últimos días de 1963, se presentaron ante el registro español 155 expedientes relacionados con este tipo de productos¹⁶⁰; los hemos agrupado, en función de la propia evaluación de sus contenidos técnicos, en nueve bloques:

1. Los extractos penicilínicos.
 - a. Procedimientos de fabricación.
 - b. Composición del medio de cultivo.
 - c. Sistema tampón con grasas.
 - d. Formas farmacéuticas especiales.
 - e. Procedimientos de estabilización.
2. Producción de penicilina en condiciones sumergidas.
 - a. Sistemas de producción.
 - b. Tipos mejorados de hongos.
 - c. Sustratos nitrogenados.
3. Sales alcalinas de penicilina.
 - a. Producción de sales alcalinas.
 - b. Mezcla con grasas: aumento de la estabilidad.
 - c. Procesos de purificación cromatográficos.
 - d. Procesos de purificación con bases orgánicas.
 - e. Disolventes de las sales envasadas.
 - f. Preparaciones extemporáneas.
 - g. Preparaciones extemporáneas con quinina.
 - h. Resistencias a penicilinasas.
 - i. Formas farmacéuticas especiales.
4. Penicilinas procaínicas.
 - a. Sales de procaína y penicilina.
 - b. Preparaciones extemporáneas.
 - c. Tamaños de partículas.
 - d. Recubrimiento de pepsina: ‘picos’ de penicilina.
 - e. Adición de fitinatos.
 - f. Sales alcalinas de penicilinas procaínicas.
5. Penicilinas biosintéticas.
 - a. Derivados amínicos.
 - b. Derivados de dibencil-etileno-diamina [penicilina benzatina].
 - c. Derivados fenoxi-metílicos [penicilina V].
 - d. Derivados con sulfatos.
 - e. Derivados de quinina.
 - f. Derivados de difenil-piperizina.
 - g. Derivados de isoquinolinas.
 - h. Derivados fenil- y fenoxi-.
 - i. Penicilinas con acción antihistamínica.

¹⁶⁰ De las ‘primeras’ patentes de penicilina registradas en España se ha ocupado Ana ROMERO DE PABLOS. “Penicillin patents in Spain”. En: Ana Romero, Christoph Gradmann, María Jesús Santemases (eds.). *Circulation of Antibiotics: Journeys of Drug Standards, 1930-1970*: 229-249. [Madrid]: European Science Foundation, 2009; pero en su estudio sólo abarca una docena de las patentes registradas por empresas extranjeras entre 1948 y 1950.

6. Penicilinas asociadas a otros antibióticos.
7. Penicilinas sintéticas: derivados del ácido 6 amino-penicilánico (6-APA).
 - a. Procedimientos de obtención.
 - b. Amino penicilinas.
 - c. Amino-carboxi penicilinas.
 - d. Alquil penicilinas.
 - e. Alcohil penicilinas.
 - f. Fluoro penicilinas.
 - g. Fenoxi-propil penicilinas.
 - h. Fenil penicilinas.
 - i. Acil-amino penicilinas.
 - j. Metil penicilinas.
 - k. Tiadiazol-amino penicilinas.
 - l. Bencil-oxi penicilinas.
 - m. Amidas del ácido 6-APA.
 - n. Indoil penicilinas.
8. Anhidropenicilinas.
9. Penicilinasas.
 - a. Penicilinasas exentas de pirógenos.
 - b. Disociadores de penicilinas.

Solicitud	Patente	Grupo	Solicitante / Patente
1945. 17-III	169.274	2.1	<i>Destilaciones Aromáticas</i> [Bilbao] Procedimiento de obtención de penicilina y otras drogas medicinales partiendo de microorganismos llamados hongos.
1945. 11-IX	170.951	2.3	<i>Herts Pharmaceuticals Limited / Roche Products Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de fabricación de apósitos para vendajes de cirugía conteniendo penicilina estable.
1945. 11-XII	171.813	2.3	<i>American Cynamid Company</i> [EE. UU.] Un procedimiento de preparar una composición terapéutica con penicilina.
1946. 30-I	172.377	2.3	<i>Hoffmann-La Roche Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento de preparar penicilina purificada.
1946. 8-II	172.503	2.1	<i>Carbonisation et Charbons Actifs S.A.</i> [Francia] Perfeccionamientos introducidos en la fabricación de la penicilina y otros productos antibióticos.
1946. 17-VII	174.340	2.3	<i>Hoffmann-La Roche Inc.</i> [EE. UU.] Un procedimiento de preparar sales de penicilina de metales alcalinos y alcalino-térreos.
1947. 11-I	176.397	2.3	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Un procedimiento para preparar sales de penicilina en gran estado de pureza.
1947. 10-II	176.753	2.3	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de purificar sales de penicilina.

1947. 31-III	177.419	2.1	<i>Julián Cardavilla del Barrio / Miguel Veníos</i> [Madrid] Procedimiento de estabilización de la penicilina para preparados de uso exterior.
1947. 19-V	178.294	2.1	<i>José Romeu Guardiola</i> [Barcelona] / <i>Isidro Alsina Argemí</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Pedro Torrella Oliva</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Carlos Más Gibert</i> [Barcelona] Procedimiento de preparación de tabletas de goma para mascar con penicilina incorporada.
1948. 19-II	182.483	2.3	<i>The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento para la obtención de preparaciones para la terapéutica con penicilina.
1948. 2-III	182.707	2.3	<i>The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.</i> [EE. UU.] Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal número 182.483 [Procedimiento para la obtención de preparaciones para la terapéutica con penicilina].
1948. 16-IV	183.316	2.3	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento para la preparación de sales de penicilina.
1948. 11-V	183.655	2.1	<i>Jesús Barrachina Aparisi</i> [Valencia] Procedimiento industrial de preparación de la penicilina de forma que sea susceptible de administrarse por vía rectal.
1948. 17-VII	184.612	2.4	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método de producir una sal de penicilina.
1948. 22-VII	184.673	2.3	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método de recuperar una sal purificada de penicilina.
1948. 7-X	185.490	2.4	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.] Método de producción de una sal de procaína de penicilina.
1948. 11-XI	185.882	2.3	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Procedimiento de producir la sal sódica o cálcica de penicilina en forma -o no- de solución, partiendo de la sal potásica de la penicilina.
1949. 21-I	186.709	2.3	<i>Société des Usines Chimiques Rhone Poulenc</i> [Francia] Procedimiento para la obtención de penicilina estable.
1949. 5-II	186.907	2.3	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona] Procedimiento para la preparación de suspensiones acuosas de penicilina.

1949. 22-II	187.163	2.4	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.] Método de preparar un producto inyectable de penicilina.
1949. 23-II	187.178	2.3	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Certificado de adición a la patente 184.673 [Método de recuperar una sal purificada de penicilina].
1949. 4-III	187.312	2.3	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento para el aislamiento y purificación de penicilina G.
1949. 4-III	187.313	2.3	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento de fabricar sales de penicilina G.
1949. 8-III	187.371	2.2	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento para la producción de penicilina.
1949. 9-III	187.378	2.2	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento para la producción de penicilina.
1949. 4-V	188.073	2.2	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Procedimiento de producir penicilina.
1949. 12-V	188.188	2.3	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Un procedimiento para producir penicilinas.
1949. 18-V	188.260	2.3	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para producir sales de penicilina.
1949. 31-V	188.443	2.3	<i>Laboratorios Vigoncal S.A.</i> [Madrid] Un procedimiento químico industrializable, para obtener una suspensión acuosa de penicilina insoluble.
1949. 16-VII	189.110	2.3	<i>EFEYN S.A.</i> [Madrid] Un procedimiento para la preparación de un vehículo para conseguir la acción sostenida de la penicilina.
1949. 27-VII	189.233	2.3	<i>EFEYN S.A.</i> [Madrid] Procedimiento para la preparación de un vehículo para conseguir la acción sostenida de la penicilina.
1949. 8-IX	189.651	2.3	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona] Procedimiento para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones de penicilina activa por vía inyectable o gástrica.
1949. 22-X	190.142	2.3	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.] Método para producir sales alcalinas de penicilina.
1949. 22-X	190.143	2.3	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.] Un método para la producción de penicilina sódica.

1949. 18-XI	190.471	2.4	<i>American Cyanamid Company</i> [EE. UU.] Método de producir una composición de penicilina revestida.
1950. 30-III	192.353	2.3	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia] Procedimiento de preparación de soluciones de penicilina de efecto prolongado.
1950. 8-IV	192.462	2.3	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de una sal de penicilina con efecto prolongado.
1950. 10-VI	193.361	2.4	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Un procedimiento de preparar precipitados cristalinos de una combinación difícilmente soluble adecuada para inyecciones de penicilina y bases orgánicas especialmente la llamada procaína-penicilina.
1950. 19-VI	193.494	2.4	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Un método de producir una sal difícilmente soluble de bencil-penicilina con bases orgánicas especialmente procaína.
1950. 6-VII	193.814	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de amino-ésteres de penicilina.
1950. 26-XII	195.938	2.3	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona] Certificado de adición a la patente 189.651 [Procedimiento para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones de penicilina activa por vía inyectable o gástrica].
1951. 13-III	196.992	2.4	<i>Eli Lilly and Company</i> [EE. UU.] Procedimiento de obtención de sales insolubles de penicilina.
1951. 27-III	197.156	2.4	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento de preparar cristales de procaína-penicilina.
1951. 4-V	197.713	2.4	<i>Aktiebolaget Kabi</i> [Suecia] Procedimiento de producir preparados de sales de penicilina.
1951. 23-V	198.008	2.5	<i>Comercial Solvents Corporation</i> [EE. UU.] Procedimiento de preparar sal de penicilina.
1951. 31-V	198.106	2.4	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento para obtener una suspensión acuosa de penicilina-procaína G.
1951. 13-VII	198.789	2.5	<i>Wyeth Inc.</i> [EE. UU.] Un procedimiento de preparar sales de penicilina insolubles en agua.
1951. 12-IX	199.562	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de preparados de penicilina.

1951. 25-X	200.134	2.4	<i>Bristol Laboratories</i> Inc. [EE. UU.] Certificado de adición a la patente 198.106 [Procedimiento para obtener una suspensión acuosa de penicilina-procaína G].
1951. 29-X	200.204	2.4	<i>Gewerkschaft Rheinpreussen</i> [Alemania] Procedimiento de preparación de soluciones de penicilina difícilmente solubles cristalizadas u oleosas.
1952. 7-III	202.360	2.3	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia] Certificado de adición a la patente 192.353 [Procedimiento de preparación de soluciones de penicilina de efecto prolongado].
1952. 14-X	205.780	2.3	<i>Instituto de Biología y Sueroterapia</i> [Madrid] Procedimiento para estabilizar las disoluciones de penicilina.
1952. 10-XI	206.205	2.5	<i>Unión Químico-Farmacéutica</i> S.A.E. [Barcelona] Procedimiento para preparar nuevos derivados de penicilina dotados de gran poder difusor.
1952. 13-XI	206.255	2.5	<i>Unión Químico-Farmacéutica</i> S.A.E. [Barcelona] Procedimiento para la preparación de una sal de penicilina dotada de gran poder retardador.
1952. 5-XII	206.653	2.5	<i>Antibióticos</i> S.A. [Madrid] Procedimiento de obtención de amino-ésteres de la penicilina.
1952. 5-XII	206.654	2.5	<i>Antibióticos</i> S.A. [Madrid] Procedimiento de obtención de amino-ésteres de la penicilina.
1952. 5-XII	206.655	2.5	<i>Antibióticos</i> S.A. [Madrid] Procedimiento de obtención de amino-ésteres de la penicilina.
1953. 27-II	208.018	2.5	<i>Glaxo Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña] Procedimiento para la preparación de nuevos derivados de penicilina.
1953. 7-III	208.132	2.5	<i>Glaxo Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña] Procedimiento para la producción de penicilina.
1953. 12-III	208.204	2.5	<i>Biochemie Gesellschaft</i> m.b.H. [Austria] Procedimiento para la obtención de penicilinas estables adecuadas especialmente para la terapia oral.
1953. 28-III	208.539	2.3	<i>Rudolf Carl Reiter</i> [Dinamarca] Procedimiento para producir sales de penicilina partiendo de sales impuras de penicilina con aminas.

1953. 27-V	209.522	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Procedimiento para la preparación de ésteres de penicilina.
1953. 16-VI	209.812	2.5	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid] Nuevo procedimiento de obtención de una sal estable de penicilina.
1953. 22-VII	210.533	2.4	<i>Farbwerke Hoechts A.G., vormals Meister Lucius & Brunnig</i> [Alemania] Procedimiento para la obtención de preparaciones de penicilina secados por congelación.
1953. 7-VIII	210.782	2.4	<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft m.b.H.</i> [Alemania] Procedimiento de fabricación de nuevos ésteres de la serie penicilínica.
1953. 19-VIII	210.907	2.5	<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft m.b.H.</i> [Alemania] Procedimiento para la obtención de un compuesto de penicilina-antihistamina.
1953. 26-VIII	211.030	2.5	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento para la preparación de una nueva sal de penicilina G.
1953. 19-XI	212.261	2.5	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.] Un método para preparar sales de penicilina.
1954. 23-I	213.291	2.5	<i>Laboratorios del Dr. Esteve S.A.</i> [Barcelona] Procedimiento para preparar la N-N'-dibenciletileno diamina dipenicilina G.
1954. 6-II	213.519	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método de producir sales de ésteres de penicilina poco solubles en agua.
1954. 19-VIII	217.052	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de mono o di-ésteres de penicilina.
1954. 11-IX	217.456	2.5	<i>Laboratorios Atral L^{tda}</i> [Portugal] / <i>Laboratorios del Dr. Esteve S.A.</i> [Barcelona] Procedimiento para preparar derivados del ácido penicilínico con actividad terapéutica.
1954. 26-XI	218.678	2.5	<i>American Home Products Corporation</i> [EE. UU.] Procedimiento para separar penicilina.
1955. 4-V	221.679	2.3	<i>Farmaceutici Italia S.A.</i> [Italia] Procedimiento para la obtención de un vehículo reactivo para la preparación extemporánea de suspensiones de penicilina que presentan actividad inmediata y persistente, o solo persistente.

1955. 7-V	221.746	2.3	<i>Farmaceutici Italia</i> S.A. [Italia] Procedimiento para la obtención de un vehículo reactivo para la preparación extemporánea de suspensiones de penicilina que presentan una acción inmediata, retardada y persistente o solamente retardada y persistente.
1955. 8-VI	222.304	2.5	<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina] Procedimiento para preparar dipenicilinos de N,N-bis (naftilmetil) etilendiaminas.
1955. 14-IX	223.973	2.5	<i>Antibióticos</i> S.A. [Madrid] Procedimiento de obtención de derivados de penicilinas insolubles o poco solubles en agua.
1955. 14-IX	223.974	2.2	<i>Antibióticos</i> S.A. [Madrid] Procedimiento de obtención de derivados de penicilinas insolubles o poco solubles en agua.
1955. 24-IX	224.139	2.4	<i>Bristol Laboratories</i> Inc. [EE. UU.] Procedimiento para mejorar la facilidad de nueva suspensión de suspensiones acuosas de penicilina.
1955. 24-X	224.622	2.4	<i>Schenley Industries</i> Inc. [EE. UU.] Un procedimiento para la producción de una sal estéril de metal alcalino de una penicilina.
1955. 12-XI	224.971	2.5	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo</i> S.L.) [Madrid] Procedimiento de obtención de una nueva sal de penicilina.
1955. 6-XII	225.437	2.5	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo</i> S.L.) [Madrid] Procedimiento de obtención de penicilina G-quinina.
1955. 7-XII	225.454	2.5	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo</i> S.L.) [Madrid] Procedimiento de obtención de sales poco solubles de penicilina V-quinina.
1956. 7-I	225.960	2.5	<i>Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas</i> S.A. [Barcelona] Procedimiento para preparar derivados del ácido penicilínico.
1956. 3-II	226.495	2.5	<i>Les Laboratoires Français de Chimiotherapie</i> [Francia] Procedimiento para la obtención de sales de penicilina de la 2,5 difenil-piperazina.
1956. 25-II	226.921	2.5	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania] Procedimiento para la obtención de sales de penicilina.

1956. 5-III	227.116	2.1	<i>Sociedad Española Basipa S.A. / Edelmiro Borrás López</i> [Barcelona] Procedimiento para la estabilización de los extractos crudos penicilínicos en soluciones hidroalcohólicas y/o en presencia de derivados mercuriales.
1956. 12-VII	229.788	2.6	<i>Leo Industrie Chimique Farmaceutiche</i> [Italia] Un procedimiento para la preparación de sales de penicilina con compuestos sulfamidados.
1956. 8-X	231.221	2.5	<i>A/S Apothekernes Laboratorium for special-preparater</i> [Noruega] Procedimiento para la preparación de sales de penicilina de dibenciletileno diamina.
1956. 9-X	231.233	2.5	<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina] Procedimiento de dipenicilinato de dibencil-etilendiamina.
1956. 11-X	231.298	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método de fabricación de una sal cristalina de una fenoximetil-penicilina.
1956. 29-XI	232.214	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Certificado de adición a la patente 231.298 [Método de fabricación de una sal cristalina de una fenoximetil-penicilina].
1956. 5-XII	232.307	2.3	<i>A/S Apothekernes Laboratorium for special-preparater</i> [Noruega] Procedimiento para la obtención de ácidos penicilínicos libres.
1956. 6-XII	232.323	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Certificado de adición a la patente 231.298 [Método de una sal cristalina de la fenoximetil-penicilina].
1957. 23-IV	234.998	2.5	<i>Imperial Chemical Industries Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de separación de sales de metal alcalino de fenoximetil-penicilina.
1957. 17-V	235.510	2.5	<i>Imperial Chemical Industries Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de obtención de nuevas sales de penicilina.
1957. 29-VIII	237.344	2.5	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método de purificación de fenoximetil-penicilina.
1958. 7-V	241.768	2.9	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.] Procedimiento para la producción de penicilinasa exenta de pirógenos.

1959. 29-I	246.912	2.5	<i>Novo Therapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca] Un procedimiento de purificar penicilina V.
1959. 4-IV	248.442	2.5	<i>Novo Therapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca] Procedimiento para preparar la sal potásica de penicilina V y G.
1959. 5-IX	251.912	2.6	<i>Leo, Industria Chimiche Farmaceutiche S.p.A.</i> [Italia] Procedimiento para la preparación de un compuesto de diferentes penicilinas con un compuesto de naturaleza sulfamídica.
1959. 2-X	252.422	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Proceso para preparación de derivados penicilínicos.
1960. 22-I	255.209	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Proceso para la preparación de penicilinas y sales atóxicas de las mismas.
1960. 22-I	255.210	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Proceso para la preparación de 6-amino-penicilánico.
1960. 30-III	256.969	2.6	<i>Société d'Etudes de Recherches et d'Applications Scientifiques et Medicinales (E.R.A.S.M.)</i> [Francia] Procedimiento para la obtención de fenoxi-metil-penicilinato de N ² -(ó 9, ó 7)-4-(beta-hidroxi-etil)-dietil-diamino-metil-tetraciclina de acción antibiótica.
1960. 7-IV	257.220	2.7	<i>Farbenfabriken Bayer A.G.</i> [Alemania]. Procedimiento para la obtención de ácidos 6-amino-penicilánico.
1960. 19-V	258.215	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Proceso para la preparación de una fórmula de penicilina y sales atóxicas de ella derivadas.
1960. 23-V	258.322	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]. Proceso para la preparación de ácidos de la fórmula general señalada y sales atóxicas de los mismos.
1960. 8-VI	258.755	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento para la preparación de nuevas penicilinas y sales atóxicas de las mismas.
1960. 20-VII	259.767	2.7	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de penicilinas.
1960. 27-VIII	260.626	2.7	<i>Farbenfabriken Bayer A.G.</i> [Alemania]. Procedimiento para la acilación enzimática de ácido 6-amino-penicilánico.

1960. 4-VIII	260.157	2.7	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de penicilinas.
1960. 10-VIII	260.287	2.9	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania] Procedimiento para la obtención de preparados encínicos [<i>sic</i> por enzimáticos] disociadores de penicilina.
1960. 27-IX	261.318	2.7	<i>Chas. Pfizer & Co. Inc.</i> [EE. UU.] Método para producir alcohol-penicilinas alfa-sustituidas.
1960. 29-IX	261.363	2.7	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de penicilinas.
1960. 30-IX	261.390	2.7	<i>Chas. Pfizer & Co.</i> [EE.UU.] Un procedimiento de preparar ácidos penicilánicos.
1960. 11-XI	262.353	2.7	<i>Farbenfabriken Bayer A.G.</i> [Alemania] Procedimiento para la obtención de ácidos 6-acilamino-penicilánicos.
1960. 23-XI	262.685	2.5	<i>Biochemie Gesellschaft m.b.H.</i> [Austria] Procedimiento para la fabricación de penicilinas.
1961. 22-III	265.959	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimientos para la preparación de nuevas penicilinas.
1961. 13-IV	266.718	2.7	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.] Método de producir alcoholpenicilina-alfa-sustituidas.
1961. 25-V	267.685	2.7	<i>Dovens Kemiske Fabrik ved a. Kongsted</i> [Dinamarca] Método para la producción de derivados de penicilinas.
1961. 5-VI	267.993	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Certificado de adición a la patente 252.422. [Proceso para preparación de derivados penicilínicos].
1961. 12-VII	269.080	2.7	<i>Rhône-Poulenc S.A.</i> [Francia] Procedimiento para la obtención de nuevos derivados del ácido amino-6-penicilánico.
1961. 11-VIII	269.787	2.7	<i>Eli Lilly and Company</i> [EE. UU.] Procedimiento para la preparación de una nueva sustancia de penicilina.
1961. 2-X	270.875	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Proceso para la preparación de una fórmula de penicilina y sus sales atóxicas.
1961. 7-XII	272.772	2.7	<i>May Baker Ltd.</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de preparación de nuevos derivados del ácido amino-6-penicilánico y sus sales atóxicas.

1961. 20-XII	273.089	2.7	<i>Novo Therapeutisk Laboratorium A.S.</i> [Dinamarca] Un procedimiento para la preparación de derivados n-acilo del ácido 6-amino-penicilánico.
1962. 16-III	275.555	2.7	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.] Procedimiento de preparación de amino-penicilinas sustituidas o no sustituidas.
1962. 3-IV	276.130	2.5	<i>Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft (Meister Lucius & Brüning)</i> [Alemania] Procedimiento para la obtención de una sal de penicilina V adecuada para la administración bucal.
1962. 2-VII	278.857	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas.
1962. 7-VII	279.025	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de preparación de alfa-amino-bencil-penicilina.
1962. 16-VIII	280.079	2.8	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.] Procedimiento de fabricación de una anhidro-penicilina.
1962. 1-IX	280.469	2.5	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid] Procedimiento de obtención de sales de penicilina con eficacia antihistáminica y antiserotonínica.
1962. 1-IX	280.470	2.5	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid] Procedimiento de obtención de sales de penicilina con eficacia antihistáminica y antiserotonínica.
1962. 13-IX	280.753	2.7	<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia] Procedimiento de preparación de penicilina.
1962. 13-IX	280.754	2.7	<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia] Procedimiento de preparación de penicilina.
1962. 10-IX	280.828	2.7	<i>Farbenfabriken Bayer A.G.</i> [Alemania]. Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 260.626, concedida en 14 de septiembre de 1.960, por "Procedimiento para la acilación enzimática de ácido 6-amino-penicilánico".
1963. 17-I	284.254	2.7	<i>Bristol Myers Co.</i> [EE.UU.] Un procedimiento para la producción de una alfa amino-bencil-penicilina.
1963. 25-I	284.536	2.7	<i>J.R. Geigy A.G.</i> [Suiza] Procedimiento para la preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico.

1963. 18-II	285.236	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento para la preparación de penicilinas.
1963. 8-III	285.853	2.7	<i>J.R. Geigy A.G.</i> [Suiza] Procedimiento para la preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico.
1963. 8-III	285.863	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de producción de penicilinas.
1963. 27-IV	287.497	2.7	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.] Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 27-IV	287.498	2.7	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.] Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 27-IV	287.499	2.7	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.] Proceso de preparación de penicilinas.
1963. 18-VI	289.148	2.7	<i>Beecham Research Laboratories, Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 5-VII	289.688	2.7	<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona] Procedimiento para la obtención de una nueva penicilina.
1963. 19-VII	290.113	2.7	<i>Roussel-Uclaf S.A.</i> [Francia] Procedimiento de preparación de un derivado de penicilina.
1963. 1-VIII	290.518	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento para preparar alfa-amino-bencil-penicilina.
1963. 10-VIII	291.104	2.7	<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona] Procedimiento de fabricación de una amida del ácido 6-amino penicilánico.
1963. 25-IX	291.973	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Certificado de adición a la patente 265.959 [Procedimientos para la preparación de nuevas penicilinas].
1963. 25-X	292.910	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas.
1963. 26-X	292.923	2.7	<i>Kkarl Thomae G.M.B.H.</i> [Alemania] Procedimiento para la obtención de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico.
1963. 27-XI	293.930	2.7	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña] Procedimiento para la preparación de penicilinas.

2.2.1. Los extractos penicilínicos

2.2.1.a. Procedimientos de fabricación

En marzo de 1945, la empresa bilbaína *Destilaciones Aromáticas S.L.* presentó a registro una patente de invención, por veinte años, para un “Procedimiento para la obtención de la penicilina y otras drogas medicinales, partiendo de microorganismos llamados hongos”¹⁶¹. El procedimiento se limita a definir las cuatro etapas de que consta el proceso: fermentación, estabilización, depuración y concentración.

La fermentación se ha de realizar en depósitos cilíndricos que tienen más altura que diámetro de la base; todas sus partes son de acero vitrificado (chapas, remaches y tubos de acceso, zona de alimentación del cultivo, toma de muestras, etc.), en su zona alta han de tener miras de cristal espaciadas. Previamente a la fermentación ha de hacerse la esterilización del depósito; en él se introduce por el tubo de alimentación el cultivo sobre el que actuará *Penicillium notatum* (u otro hongo adecuado), por ejemplo 120 g. de una preparación glucosada ligeramente ácida y sales de fosfato amoniacal en cantidad adecuada; se ha de refrigerar externamente para que la temperatura sea de 25° a 30° C. A continuación se introduce, de forma aséptica, una cantidad de hongo adecuada; se cierran la zona de toma de muestra así como las tuberías de vapor, pero se abre la tubería de aire esterilizado y comprimido a una atmósfera de presión, que es preciso mantener durante todo el proceso de fermentación. Se consigue así un ambiente completamente aislado del exterior y que está bien aireado, esterilizado y con energía suficiente para producir la fermentación de toda la masa introducida en el depósito. En un tiempo menor de 48 horas toda la masa ha fermentado, sea cual sea su cantidad, ya que -según los autores-, 20 micelas con esporas de *Penicillium* (o de otros hongos), son suficientes para dejar fermentada, en menos de 4 horas, una masa de 100.000 litros.

Mientras ocurre el proceso de fermentación, se analizan cada cierto tiempo muestras extraídas de la masa de reacción, sin ponerlas en contacto con el ambiente exterior, hasta que por métodos físico-químicos, como puede ser determinar la concentración de glucosa presente en la masa de reacción por medio de densímetros, brixómetros o decoloraciones vistas al microscopio, puede determinarse que toda la masa de fermentación está saturada de penicilina.

Estando la fermentación realizada por el hongo en su punto culminante y antes de que comiencen a producirse fermentaciones secundarias alcohólicas, disminuyendo por tanto los elementos penicílicos obtenidos, es necesario poner el líquido filtrado asépticamente en contacto con alcoholes o ésteres que detienen la fermentación y que fácilmente se recuperan en las operaciones sucesivas. Es éste el segundo paso, al que los autores denominan de estabilización.

La operación anterior, aunque es estabilizadora y depurativa, es insuficiente si se pretende obtener un producto de uso medicinal y además inyectable, por lo que es necesario seguir purificando la masa reactiva; para ello se emplean ésteres neutros, como el acetato de amilo, destinados a disolver y arrastrar consigo las materias resinosas que pudieran tener efectos patógenos. Es a ésta fase a la que en la memoria se define como depuración.

¹⁶¹ AHOEPM, patente 169.274; la memoria descriptiva consta de seis hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 17-III-1945. La empresa tiene fijado su domicilio en Bilbao. La patente, de invención, fue concedida el 20-III-1945.

Eliminados los ésteres añadidos, se purifica la linfa y se procede a concentrarla en aparatos de vacío potentes y a bajas temperaturas, contruidos -como todos los intervinientes en el proceso- de acero vitrificado. Constantemente se ha de controlar este proceso, por lo que la toma de muestras es frecuente. Cuando la concentración es la adecuada, se inyecta asépticamente una solución de sales sódicas y se continúa la concentración hasta sequedad. Luego se procede a la valoración del producto obtenido en unidades Oxford [U.O.]¹⁶². Por último, el producto se envasa.

2.2.1.b. Composición del medio de cultivo

El 8 de febrero de 1946 la empresa francesa *Carbonisation et Charbons Actifs* S.A. presentó, ante el registro español de patentes, un expediente concerniente al “Perfeccionamiento introducido en la fabricación de la penicilina y otros productos antibióticos”¹⁶³.

Los autores de esta memoria, Broch, Kreharo, Netick y Pangier, señalan haber comprobado, de manera experimental, que en la fabricación de la penicilina, si los medios de cultivo previamente se tratan con carbones activos decolorantes y, sobre todo, con carbones activados por vapor de agua, hay una gran disminución de los componentes indeseables. Estos investigadores, trabajando sobre la depuración de los medios de cultivo, llegan a la conclusión que, un medio compuesto por lactosa al 2%-4%, ‘corn-steep liquor’ [maíz empapado en licor] al 5%-15%, fosfato monopotásico, nitrato de sosa y agua a un pH de 5.4, sustenta un cultivo cuya riqueza en penicilina, al cabo de 10 a 12 días, es de 50-80 U.O./cm³.

Si el mismo medio se hubiese tratado, en condiciones de temperatura variable, con un 1%-3% de carbón activado con vapor de agua, operando al mismo pH inicial y sembrado como el caso anterior, proporciona, según estos autores, un desarrollo más rápido y más abundante de *Penicillium* y una concentración de penicilina entre 100-200 U.O./cm³.

Precisamente ésta es la ventaja económica del procedimiento, pues tiene un aumento del rendimiento de penicilina del 100%. Hay, además, otra ventaja añadida; sucede que las variaciones de pH, según se modifica la concentración de penicilina, no son muy marcadas con respecto a las que ocurren en el cultivo realizado en un medio que previamente no se ha depurado.

Los autores repitieron el proceso con carbón activado en una cantidad de 5% a 10%; el aumento de la rapidez del crecimiento y la riqueza de penicilina apenas fue mejorado. Si se exageran las dosis de carbono empleadas en el tratamiento previo ocurre un ligero retraso en el crecimiento del *Penicillum*, por lo que se puede suponer -señalan los autores- que una depuración demasiado intensa del medio tal vez elimina los elementos favorables del crecimiento del hongo y afecta a la formación y/o estabilidad de la penicilina formada.

¹⁶² La Unidad Oxford se define como la cantidad mínima de penicilina que, disuelta en 50 ml. de caldo de carne, inhibe completamente el desarrollo de un cultivo de *Staphylococcus aureus*.

¹⁶³ AHOEPM, patente 172.503; la memoria queda firmada, en Madrid, el 8-II-1946. La empresa tiene fijado su domicilio en París. La patente, en la modalidad de invención, fue aprobada el 9-II-1946 y publicada el 16-III-1946.

2.2.1.c. Sistema tampón con grasas

El 31 de marzo de 1947, un par de empresarios: español uno, Julián Cardavilla del Barrio; ruso otro, Miguel Veníos, ambos residentes en Madrid, presentan ante el registro de patentes un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento de estabilización de la penicilina para preparados de uso externo”¹⁶⁴.

Los autores parten de la idea de que el caldo penicilínico resultante de la siembra en medio de cultivo sintético ‘Czapek-Dox’ es muy inestable, lo que obliga a la extracción inmediata del principio activo; una vez extraído éste la penicilina sólo mantiene su actividad, y por unos días, en los disolventes orgánicos. El procedimiento objeto de esta patente trata de mejorar el problema de la estabilización de la penicilina, de tal forma que su estado activo se prolongue durante un tiempo suficiente para las exigencias del comercio habitual y que, además, se pueda conservar en recipientes que no necesiten ser cerrados herméticamente, y a temperatura ambiente, en todas las épocas del año.

En la memoria se mantiene que todas las grasas que contengan fósforo, azufre o algunos de sus compuestos, originan un tampón con la penicilina, produciendo un sistema de estabilidad. Si la penicilina se adiciona a una crema o pomada hecha con lanolina y grasas hidrogenadas (aceites de almendra, de oliva o de cacahuete), ésta conserva su actividad durante mucho tiempo, sin que sea necesario mantenerla a baja temperatura, ni preservarla de la luz, ni del contacto con el aire; añaden como elemento estabilizador algunos antisépticos, como el para-oxibenzoato de metilo, de butilo o de propilo e incluso simultáneamente dos de ellos, en la proporción de 2/1000 ó 1/1000 de cada uno¹⁶⁵.

2.2.1.d. Formas farmacéuticas especiales

El 19 de mayo de 1947 un grupo de empresarios catalanes, probablemente vinculados al sector textil: José Romeu Guardiola¹⁶⁶, Isidro Alsina Argemí¹⁶⁷, Pedro Torrella Oliva¹⁶⁸ y Carlos Más Gibert¹⁶⁹, presentaron un expediente para introducir, en

¹⁶⁴ AHOEPM, patente 177.419; la memoria descriptiva queda firmada, en Madrid, el 31 de marzo de 1947. La patente, de invención, fue concedida el 30-VI-1947 y publicada el 1-X-1947. No disponemos de más datos sobre Julián Carcavilla del Barrio ni sobre Miguel Veníos; no parece que presentaran más expedientes de solicitud de patentes.

¹⁶⁵ A título de ejemplo, señalan que una crema fabricada con estos medios ha dado magníficos resultados de estabilización, conservando la penicilina su actividad después de encontrarse 180 días a una temperatura constante de 27° C.

¹⁶⁶ No disponemos de datos sobre él; quizás pueda tratarse de un abogado fallecido en 1994 (*La Vanguardia*, [15-I-1995]: 32. Barcelona, 1995), que fuera procurador en Cortes en los inicios de la década de 1960 (*La Vanguardia*, [1-III-1960]: 19. Barcelona, 1960). En la documentación consultada consta, junto a Isidro Alsina, como residente en Sabadell, en el número 160 de la Carretera de Tarrasa.

¹⁶⁷ En 1966 figura como propietario de una industria textil en Sabadell (M. Dolors CALVET PUIG. *Incidència de l'urbanisme en la funció econòmica i social de la ciutat: el rol de les ciutats mitjanes en un entorn metropolità*. [Tesis doctoral, dirigida por Francesc Solé Parellada y Pere Alavedra Robot]. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya, 2005 (cf. anexos, pág. 55). En la fecha que nos compete (1947), residía en Sabadell, en el número 160 de la Carretera de Tarrasa, el mismo domicilio señalado por José Romeu.

¹⁶⁸ Sólo nos consta su residencia en Sabadell, calle Manso 23.

España y colonias, un “Procedimiento de preparación de tabletas de goma de mascar, con penicilina incorporada”¹⁷⁰.

Los promotores de esta patente justifican la conveniencia de poner en circulación unas pastillas, conocidas con el nombre de ‘chicle’, con propiedades refrescantes debido a que en su composición incluyen mentol y ácido cítrico, acompañados de una esencia adecuada para aromatizar y refrescar la boca; a este producto se le incorpora penicilina, logrando así efectos terapéuticos.

El proceso de elaboración de estas tabletas de goma de mascar con penicilina incorporada se desarrolla del siguiente modo: comienzan preparando una masa plástica de una sustancia parafinada insoluble, a la cual se le añade una esencia aromatizante a fin de que adquiera un sabor agradable al paladar (sabor cítrico, mentolado u otros similares); por simple mezcla, a dicha masa se incorpora la cantidad necesaria de penicilina para conseguir unas 20.000 U.I. por cada pastilla o ‘chicle’. Ya preparada la pastilla masticable puede ser -o no- grageada. El elemento esencial del procedimiento es conseguir una estabilización más o menos duradera de la penicilina incorporada.

La penicilina que se mezcla con la masa plástica es en forma de sal cálcica soluble, emulsionada con retardadores grasos al objeto de que se libere lentamente y se mezcle con la saliva. Los autores de la memoria mantienen que se puede garantizar una estabilización perfecta de la penicilina contenida en el ‘chicle’ siempre que se mantengan las pastillas masticables a una temperatura inferior a los 15° C. No obstante, afirman que, a mayores temperaturas, resiste a la alterabilidad durante un día, el tiempo que necesita el usuario para consumir el contenido de pastillas masticables que hay en un envase apropiado, que recomiendan se fabrique con corcho u otro material aislante del calor.

El 11 de mayo de 1948, el empresario valenciano Jesús Barrachina Aparisi presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a “Un procedimiento industrial de preparación de la penicilina, de forma que sea susceptible de poderse administrar por vía rectal”¹⁷¹.

El procedimiento de fabricación de estos supositorios es éste: se mezcla, a una temperatura no superior a 10° C, los siguientes compuestos: ésteres colesterínicos, alcohol melísico y cerótico en partes iguales y colestestina; la mezcla se tritura para formar una masa homogénea, estable, no evacuable y absorbible, que funde alrededor de 37° C. A esta masa se añade penicilina en la proporción de 10.000 U.O. por cada dos gramos de masa, o mayor cantidad según la dosis que se desee administrar. A continuación esta masa se convierte en supositorios al someterla a una presión que le

¹⁶⁹ Probablemente ingeniero textil, en octubre de 1954 figura como vicedirector de la Escuela de Ingenieros Industriales de Tarrasa (*La Vanguardia*, [24-X-1954], p. 20. Barcelona, 1954). En 1947, en el momento de presentar esta solicitud, su domicilio consta en calle Diputación 224 de Barcelona.

¹⁷⁰ AHOEPM, patente 178.294; la memoria descriptiva tiene cuatro hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola cara, firmadas en Barcelona a 19 de mayo de 1947. El producto era comercializado, fuera de nuestras fronteras, por *E.R. Squibb & Sons*, domiciliados en Nueva York, en el número 745 de la Quinta Avenida. La patente española fue concedida el 2-VI-1947 y hecha pública el 1-VIII-1947.

¹⁷¹ AHOEPM, patente 183.655; la memoria descriptiva queda firmada en Madrid, a 11 de mayo de 1948. Del solicitante de la patente sólo sabemos su domicilio en este año: el número 27 de la calle de Fernando el Católico de Valencia. La patente fue concedida el 25-VI-1948 y hecha pública el 1-XI-1948.

obligue a pasar por unos tubos de un diámetro conveniente, según la estructura que se le quiera dar, cortándolas al peso y/o medida que convengan; se envasan en tubos o ampollas de cristal neutro, completamente asépticos, cerrados o no al soplete y se presentan en cajas de un material aislante.

2.2.1.e. Procedimientos de estabilización

Aun avanzado 1956 una empresa española, *Sociedad Española Basipa S.A.* asociada al empresario Edelmiro Borrás López¹⁷², se interesa por la producción de extractos penicilínicos; el 5 de marzo de ese año presentó a registro una solicitud de patente para proteger “Un procedimiento para la estabilización de los extractos crudos penicilínicos en soluciones hidroalcohólicas y/o en presencia de derivados mercuriales”¹⁷³.

Los autores parten de la mayor actividad terapéutica demostrada por los extractos crudos de los cultivos de diversas cepas de *Penicillium albus* y *P. glaucus*, superior a la de las penicilina comerciales, probablemente debido a la presencia en ellos de sustancias acompañantes que potencian la actividad del antibiótico¹⁷⁴.

¹⁷² Edelmiro Borrás López (ca. 1899-1971) presentó, ante el registro español de patentes, un buen número de procedimientos entre agosto de 1940 y enero de 1967. Sus primeros intereses, en los comienzos de los años 1940, se decantan hacia el ámbito cinematográfico: “Un procedimiento para obtener efectos ópticos de relieve en la fotografía y en las proyecciones cinematográficas” (AHOEPM, patente 150.370. 22-VIII-1940); “Un procedimiento para obtener efectos ópticos de relieve en la fotografía y en las proyecciones cinematográficas” (AHOEPM, patente 150.500. 16-IX-1940); “Un procedimiento de producción de películas cinematográficas, llevando los elementos para producir los efectos de relieve y para ser proyectadas reproduciendo los colores de la naturaleza” (AHOEPM, patente 151.683. 11-XII-1940); “Un procedimiento de reproducción de sonidos y de la voz humana en el interior de vehículos de transporte de viajeros” (AHOEPM, patente 156.013. 30-I-1942). En los años centrales de la década de 1940, asociado con otros empresarios, se adentra en el mundo de los productos químicos: “Un procedimiento industrial para la obtención de un combustible líquido sulfhidrocarbonado” (junto a Esteban Vicens Rodoreda, AHOEPM, patente 170.984. 3-IX-1945); “Un procedimiento de conservación de sustancias orgánicas y productos alimenticios” (AHOEPM, patente 173.481. 11-IV-1946); “Un procedimiento industrial para la fabricación de materias colorantes viradoras por oxidación metálica” (en colaboración con José Puig Vidal. AHOEPM, patente 173.848. 27-V-1946); “Un procedimiento para la obtención de medios y productos detergentes, propios para el lavado manual o mecánico” (AHOEPM, patente 192.368. 31-III-1950); “Nuevo procedimiento para la preparación de materias colorantes aplicables a los tintes industriales y domésticos y a las artes decorativas de la pintura” (junto a *Industrias Nitrocel S.L.* AHOEPM, 213.328. 22-I-1954); “Un procedimiento para la estabilización de los extractos crudos penicilínicos en soluciones hidroalcohólicas y/o en presencia de derivados mercuriales” (en colaboración con *Basipa S.A.* AHOEPM, 227.116. 5-III-1956). En la década de los sesenta parece decantarse por los procesos medio-ambientales: “Un procedimiento de esterilización de basuras y desperdicios de comidas destinados a la alimentación animal” (AHOEPM, patente 274.490. 3-II-1962); “Procedimiento para la conversión de materiales celulósicos vegetales en un complejo orgánico fertilizante para la Agricultura” (AHOEPM, 336.126. 27-I-1967). *La Vanguardia* (3-VII-1971: 25. Barcelona, 1971), indica que falleció el 10-VII-1971, a la edad de 72 años.

Basipa S.A. fue una empresa dedicada, al menos en los comienzos de la década de 1960, a la comercialización de insecticidas (ABC, 25-III-1962: 40. Madrid, 1962).

¹⁷³ AHOEPM, patente 227.116; la memoria descriptiva consta de seis hojas foliadas y escritas a máquina, por una sola cara, fechadas en Madrid, a 5 de marzo de 1956, firmadas por Edelmiro Borrás López, en representación de la empresa *Sociedad Española Basipa S.A.*, domiciliada en Barcelona, calle Caspe, número 26. La patente fue concedida el 14-III-1956 y publicada el 1-V-1956.

¹⁷⁴ Remiten a los estudios de W.B. DUNHAM, G. RAKE. “The relative activity of partially purified penicillin and of crystalline penicillin on *Treponema pallidum*”. *American Journal of Syphilis, Gonorrhea and Venereal Diseases*, 28: 214-218. St. Louis, 1945 y Gladys L. HOBBS, Tulita F. LENERT, Beverly

El procedimiento objeto de esta patente es establecer un tratamiento de estabilización de los extractos integrales de *Penicillium albus* o de *Penicillium glaucus*, en presencia de sales mercuriales, para lo cual se tratan mediante derivados aromáticos o terpen-sulfo-carboxílicos. Lograda esta estabilización, se consigue un aumento considerable del poder antibiótico de la penicilina, un superior espectro antibacteriano de la misma y una elevada resistencia frente a los agentes hidrolíticos que provocan su desintegración, tales como la penicilinasas o el alcohol etílico.

Por ensayos practicados con este producto, los autores mantienen que se ha podido comprobar, tanto *in vitro* como *in vivo*, que el espectro antibacteriano de este derivado es muy superior al de la suma de los espectros de cada uno de los componentes parciales aislados: iones mercuriosos, penicilina y compuestos aromáticos o terpen-sulfo-carboxílicos, todos ellos de aplicación práctica en la terapéutica usual, demostrándose así que esta asociación medicamentosa tiene un sinergismo farmacológico que provoca una elevada actividad antibacteriana y antiinflamatoria del producto.

En definitiva, esta invención comprende una técnica de estabilización de los extractos hidroalcohólicos crudos de penicilina, asociados a sales mercuriales, tanto de ácidos minerales como de ácidos orgánicos, utilizando para ello la presencia de compuestos sulfa-carboxílicos aromáticos o terpénicos¹⁷⁵.

2.2.2. Producción de penicilina en condiciones sumergidas

Los procedimientos primigenios para la producción de penicilina realizan el crecimiento de *Penicillium notatum* en tampón superficial estacionario, en capas de medios de escasa profundidad. Estos procedimientos son desventajosos para las operaciones comerciales de producción en gran escala. Desde los comienzos de la década de 1940 se investiga la utilización de razas de *Penicillium* productoras de penicilina en condiciones sumergidas. El procedimiento sumergido presenta muchas ventajas sobre el de capa a poca altura, representando un gran ahorro de espacio, tiempo, trabajo y equipo, abaratándose en consecuencia los gastos de producción.

2.2.2.a. Sistemas de producción

Con fecha de 8 de marzo de 1949, la empresa norteamericana *Merck & Co.* presentó a registro una patente de introducción, por diez años, para “Un procedimiento para la obtención de penicilina”¹⁷⁶.

HYMAN. “The effect of impurities on the chemotherapeutic action of crystalline penicillin”. *Journal of Bacteriology*, 54: 305-323. Washington DC, 1947.

¹⁷⁵ Los autores proponen, como casos prácticos, tres técnicas de elaboración del producto objeto de esta invención; nos ocupamos sólo de la primera: se prepara un extracto hidroalcohólico de penicilina, procediendo según las técnicas descritas en la bibliografía científica a partir de los cultivos de *Penicillium* obtenidos por la siembra de un medio de cultivo semisólido de pulpa y cortezas de naranja trituradas y sales minerales y la proporción correspondiente del derivado sulfocarboxílico; se adicionan a temperatura baja 1.500 cm³ del extracto hidroalcohólico obtenido y 490 cm³ de una solución hidroalcohólica coloidal de benzoato mercurioso, preparado a una concentración adecuada para que el contenido en iones mercuriosos sea un 2,5% del volumen total del líquido.

¹⁷⁶ AHOEPM, patente 187.371; la memoria descriptiva consta de catorce hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid a 8-III-1949. La entidad figura como establecida en el

Este método permite producir penicilina, con grandes rendimientos, en condiciones sumergidas, mediante aireación o aireación con agitación mecánica, mientras el medio se mantenga a un pH de 6,0-8,5¹⁷⁷. En tales condiciones sumergidas de formación de penicilina se obtiene un crecimiento exuberante del moho, mucho más rápido que en los cultivos estacionarios y, además, el microorganismo crece homogéneamente a través de la masa del medio líquido. La proporción de formación de las penicilinas se acelera marcadamente en condiciones sumergidas, consiguiéndose el máximo de penicilina en un período de tiempo más corto, de 2 a 6 días, que el requerido en las condiciones de crecimiento superficial estacionario, de 7 a 14 días o más.

La aireación, o la aireación con agitación, que se emplea en este procedimiento, se logra por cualquier dispositivo que garantice la disolución del aire a través de todo el medio. Se puede hacer pasar aire a través de la zona central del medio en un tanque de bastante altura, que se conduce por medio de una simple apertura del tubo; la disolución adecuada del aire se realiza por agitación mecánica, por ejemplo, mediante hélices o por medio de un tubo mezclador. También la disolución del aire puede conseguirse al pasarlo por unos pulverizadores o dispositivos similares, que ‘desmenuzan’ el aire de forma que se presenta una mayor superficie a las células suspendidas en el medio; en este caso, la agitación mecánica puede reducirse o eliminarse totalmente, siendo suficiente el paso del aire a través del líquido para proporcionar una agitación adecuada.

De acuerdo con este procedimiento, son posibles varios métodos para la producción de penicilina en condiciones sumergidas. Tales medios deben contener un material nutritivo que incluya una fuente de carbono y energía; en algunos casos los medios pueden contener, además, una mezcla orgánica compleja con sustancias nitrogenadas. También se pueden utilizar sales minerales nutritivas como, por ejemplo, sales nitradas, tales como sales de sodio, potasio, magnesio o calcio, así como urea, sales amoniacales, líquido de maceración del maíz, etc. Las sales minerales nutritivas pueden usarse en diversas combinaciones y concentraciones; una composición adecuada, propuesta por los autores de esta memoria, es la siguiente: NaNO₃ (6 g.), KH₂PO₄ (1,5 g.), MgSO₄·7H₂O (0,5 g.) por litro de agua. Como fuentes de carbono y energía se utilizan sustancias asimilables por los *Penicillium* productores de penicilina, donde se incluyen los hidratos de carbono, el glicerol, las mezclas de los mismos, líquido de maceración del maíz, etc. La fuente de carbono y energía puede usarse en

126, East Lincoln Avenue, Rahway (New Jersey. EE. UU.). La patente, tipificada como de introducción, fue aprobada el 23-V-1949 y hecha pública el 16-VII-1949.

¹⁷⁷ Los autores señalan, en la memoria descriptiva, que cuando usan la palabra ‘penicilina’ están haciendo referencia a la sustancia antibacteriana producida por mohos pertenecientes al género *Penicillium* en un pH del medio neutro o ligeramente alcalino; las propiedades de esta sustancia fueron descritas por Edward ABRAHAM, Ernst Boris CHAIN, C.M. FLETCHER, A.D. GARDNER, N.G. HEATLEY, M.A. JENNINGS, H.W. FLOREY. “Further observations on penicillin”. *The Lancet*, 238: 177-189. Londres, 1941 y Edward ABRAHAM, Ernst Boris CHAIN, E.R. HOLIDAY. “Purification and some physical and chemical properties of penicillin: with a note on the spectrographic examination of penicillin preparations”. *The British Journal of Experimental Pathology*, 23(3): 103-119. Londres, 1942; a diferencia del principio diferente aislado y descrito por C.E. COULTHARD, R. MICHAELIS, W.F. SHORT, G. SYKES, G.E.H. SKRIMSHIRE, A.F.B. STANDFAST, J.H. BIRKINSHAW, H. RAISTRICK. “Notatin: an Antibacterial Glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling”. *Nature*, 150: 634-635. Londres, 1942; y por E.C. ROBERTS, C.K. CAIN, R.D. MUIR, F.J. REITHEL, W.L. GABY, J.T. VAN BRUGGEN, D.M. HOMAN, Philip A. KATZMAN, L. R. JONES, Edward A. DOISY. “Penicillin B, an antibacterial substance from *Penicillium notatum*”. *The Journal of Biological Chemistry*, 147(1): 47-58. Baltimore, 1943, y que es formado por hongos pertenecientes al género *Penicillium* cuando el medio es ácido, en la escala de pH 3,0-5,0.

concentraciones que oscilan entre el 0,5%-10% y, preferentemente, en concentraciones de 1%-4% por volumen de medio.

Algunas sustancias, entre ellas el líquido de maceración del maíz, contienen gran cantidad del material nutritivo necesario como fuente de carbono y energía asimilables por los *Penicillium* productores de penicilina y, por tanto, es un medio adecuado, de acuerdo con los autores de este procedimiento. Cuando se emplea un medio de cultivo que contiene sales minerales nutritivas y una fuente de carbono, como puede ser glicerol, azúcar moreno, dextrosa, melaza, sacarosa o almidón, la velocidad de formación de penicilina se incrementa si, a tal medio, se le añaden mezclas orgánicas complejas que contengan sustancias nitrogenadas¹⁷⁸. Si las sustancias usadas en el medio son muy ácidas, como lo es el líquido de maceración del maíz, es aconsejable añadir un agente neutralizador, como el carbonato de calcio, álcalis solubles (NaOH ó KOH) o mezclas de carbonatos de calcio y álcalis solubles; el agente neutralizador puede ser añadido en una cantidad de ca. 0,2-10 g. a un medio que contenga 30 ml. de líquido de maceración del maíz por litro de medio. En lugar de añadir el agente neutralizador al medio, las mezclas orgánicas complejas que comprenden sustancias nitrogenadas pueden tratarse con él antes de su adición. Para optimizar los resultados, este procedimiento se ha de realizar a una temperatura de 20°-25° C, aunque pueden también emplearse temperaturas no comprendidas en esta escala.

Las sales de cinc, como el sulfato de cinc, tiene un efecto estimulante sobre la producción de penicilina en condiciones sumergidas, pero cuando están en presencia de mezclas orgánicas complejas, que comprenden sustancias nitrogenadas, la sal de cinc parece carecer de tal efecto. La sal de cinc puede estar contenida como impureza en alguno de los constituyentes, tales como el agua o sales nutritivas impurificadas, en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades del proceso, por lo que no es necesario añadirla al medio.

Otro detalle a tener en cuenta: en condiciones sumergidas, la producción y la acumulación de penicilina es muy satisfactoria en tanques construidos de acero al carbono. Es conveniente que no se forme espuma durante la esterilización del medio y durante el proceso sumergido, por lo tanto puede añadirse al medio un agente antiespumante eficaz, tal como citrato tributílico o aceite de ricino sulfonado.

En definitiva, los autores patentan un proceso sumergido, en un medio seleccionado que, en condición estéril, es inoculado con *Penicillium notatum* o *Penicillium chrysogenum*. El proceso se deja avanzar en condiciones de aireación, o de aireación y agitación, hasta alcanzar la máxima actividad productora de penicilina, observada por los correspondientes análisis de muestras de los filtros de cultivo. En la memoria descriptiva se incluyen algunos ejemplos dentro del amplio alcance de esta patente¹⁷⁹.

¹⁷⁸ Entre estas mezclas orgánicas complejas que contienen sustancias nitrogenadas y que son útiles para producir penicilina se deben incluir el líquido de maceración del maíz, harina de tortas de haba de soja, harina de semillas de algodón y extracto de levadura.

¹⁷⁹ De la más de una docena de ejemplos propuestos señalamos el primero de ellos: se opera con 2.700 litros de medio estéril, formado con la siguiente composición por litro de agua: líquido de maceración del maíz (30 ml.), azúcar moreno [calidad nº 13, blanda] (20 ml.), NaNO₃ (6 g.), KH₂PO₄ (1,5 g.), MgSO₄·7H₂O (0,5 g.) y CaCO₃ (5 g.). El medio estéril se introduce en un tanque de 3.400 litros; se añade un fuerte inóculo de *Penicillium notatum*. La mezcla se airea continuamente por medio de un pulverizador de tubo anular, que tiene agujeros de 1,6 mm. El flujo del aire se establece en 540 dm³/min.

El 4 de mayo de 1949 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó, ante el registro español, la solicitud de una patente de invención para proteger, por veinte años, “Un procedimiento de producir penicilina”¹⁸⁰, utilizando como precursor los derivados del ácido fenacetúrico.

El ácido fenacetúrico, $C_6H_5-CH_2-CO-NH-CH_2-COOH$, en comparación con el ácido fenilacético -habitualmente empleado como precursor-, contiene el grupo amido, la cadena lateral y dos de los enlaces del anillo de cuatro enlaces de la penicilina; por estas razones es útil para ser usado como precursor¹⁸¹. El ácido fenacetúrico es bastante soluble en los disolventes orgánicos utilizados para extraer penicilina y posee una cierta solubilidad en agua a los bajos valores de pH empleados; ello origina el inconveniente de que el ácido estará presente tanto en la fase acuosa como en el disolvente orgánico empleado para la extracción y, en consecuencia, pequeñas cantidades del mismo seguirán a la penicilina durante una parte, mayor o menor, de los procedimientos realizados para extraerla.

En este procedimiento, los ésteres del ácido fenacetúrico empleados pueden ser o bien ésteres formados con alcoholes alifáticos comunes (tal como etanol) o ésteres con alcoholes que contienen nitrógeno, especialmente amino-alcoholes terciarios. El tipo de ésteres citados en primer lugar son, generalmente, más solubles en disolventes de extracción orgánica que el ácido fenacetúrico y no son solubles -o lo son en pequeña medida- en agua; por lo tanto, no acompañan a la penicilina cuando se extrae del agente de cultivo; además, son prácticamente incapaces de penetrar en la fase acuosa subsiguiente, en la que se produce la extracción con un neutralizador; en consecuencia, se separan fácilmente de la penicilina.

Esta separación entre los ésteres del ácido fenacetúrico y la penicilina puede realizarse, aún más fácilmente, por los ésteres del ácido fenacetúrico con alcoholes que tienen nitrógeno, en particular con los aminoalcoholes terciarios y, dentro de ellos, aquellos que tienen el nitrógeno formando parte de un anillo. Estos ésteres son solubles en agua a pH menor de 7, pero no lo son en los disolventes orgánicos de extracción y, por lo tanto, pueden separarse de la penicilina cuando ésta es extraída del agente nutritivo que contiene agua, por medio de un disolvente orgánico de extracción, como es, por ejemplo, el acetato amílico o similares.

Los efectos tóxicos que ejercen, los ésteres empleados en este procedimiento, sobre los microorganismos productores de penicilina son muy suaves, por lo que toda la cantidad deseada de ésteres pueden añadirse al agente nutritivo de una vez. Son pues, más útiles que el ácido fenilacético, ya que este ácido, en las cantidades necesarias, es

y a una presión de 0.55-0.83 kg./cm². Al cabo de cinco días se extrajo una muestra del cultivo y mostró en el análisis 40 unidades Florey/ml. [Unidad Florey es el nombre de la Unidad Oxford en Estados Unidos].

¹⁸⁰ AHOEPM, patente 188.073; la memoria descriptiva consta de siete hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 4-V-1949. La patente, de invención, fue aprobada el 5-V-1949 y publicada el 16-VII-1949. La empresa figura como establecida en el número 19 de Bronshøjvej, Copenhague (Dinamarca).

¹⁸¹ Los propios autores señalan que es sorprendente que estos ésteres puedan promover la formación de penicilina G en mayor grado que los precursores hasta entonces conocidos, porque fácilmente se transforman en ácido fenilacético en las condiciones biológicas para el crecimiento del microorganismo, aunque no más que el mismo ácido fenacetúrico.

nocivo para el microorganismo, por lo que tiene que añadirse poco a poco y esto supone un mayor trabajo, mayor control y un riesgo de infección¹⁸².

2.2.2.b. Tipos mejorados de hongos

El 9 de marzo de 1949 la empresa norteamericana *Merck & Co.* presentó a registro una patente de invención, por veinte años, para “Un procedimiento para la obtención de penicilina”¹⁸³. El procedimiento aumenta la producción de penicilina por fermentación, en condiciones aeróbicas sumergidas, en un medio acuoso nutritivo donde sintetizar más de dos tercios de un miligramo de bencil-penicilina por milímetro de caldo fermentado de un hongo adecuado.

En gran parte gracias a los trabajos de investigación desarrollados por *Merck & Co.*, los hongos productores de penicilina experimentaron una variación en su capacidad de producirla; algunas mejoras se lograron por la selección de tipos procedentes de la naturaleza y por medio de mutación artificial. Así, el mutante artificial *Penicillium chrysogenum* Q-176, cuyo tipo conserva la *American Type Culture Collection* de Washinton, D.C., fue considerado, hasta la fecha de presentación de esta patente [1949], como el mejor productor de penicilina disponible. Su máxima producción osciló desde unas 900 a 1.000 U.I. de penicilina por mililitro de caldo fermentado.

No obstante, este rendimiento resultaba aún económicamente inadecuado, pues representa menos de dos tercios de miligramo de penicilina por miligramo de caldo y, además, en su desarrollo era necesario el empleo de amplios equipos y complicados procedimientos para la producción industrial de penicilina. Los inconvenientes de un rendimiento tan reducido aumentan por el hecho de que, en la producción microbiológica de penicilina, en el caldo fermentado se forman varias penicilinas que difieren química y biológicamente. Dentro de ellas, la más deseada desde el punto de vista terapéutico es la bencil-penicilina, y las proporciones en las cuales se encuentra en el caldo fermentado se pensaba que dependían de las condiciones del cultivo, pero los autores de este procedimiento mantienen que también depende, en gran medida, del tipo de hongo empleado en la fermentación.

En las condiciones de la producción industrial, la proporción de bencil-penicilina entre las penicilinas producidas por *Penicillium chrysogenum* Q-176 pocas veces supera el 60%, o sea que el caldo de este mutante contiene de 540 a 600 U.I. de bencil-penicilina por mililitro de caldo, es decir que, en un rendimiento normal, se obtiene aproximadamente un tercio de miligramo por mililitro. También hay otro inconveniente

¹⁸² Los autores ilustran este procedimiento por medio de un ejemplo: en un autoclave se introducen 300 kg. de líquido de maceración del maíz, 80 kg. de lactosa, 40 kg. de carbonato cálcico y 400 l. de agua; todo ello se inocula con un cultivo adecuado de *Pennicillium notatum* / *Penicillium chrysogenum* y luego se fermentan en un recipiente cerrado, aireando enérgicamente; al cabo de 60-70 horas, la producción de penicilina es de 300 U.I./ml., de las cuales ca. un 90% son de penicilina K. Si antes de la introducción en el autoclave de la mezcla dicha, y de que ésta sea inoculada, se añaden 900 g. del éster del ácido fenacetúrico con dietil-amino-etanol se obtienen, por fermentación de la misma manera, más de 900 U.I./ml., de las cuales ca. un 90% son de penicilina G. Si se emplea el ácido fenacetúrico en cantidad equivalente, solamente se obtienen 600-700 U.I./ml.; puede aumentarse la cantidad de éster añadido sin originar una acción perjudicial sobre el microorganismo.

¹⁸³ AHOEPM, patente 187.378; esta memoria consta de quince hojas, escritas por una sola cara, firmadas en Madrid, a 9-III-1949. El expediente se corresponde al presentado en Estados Unidos de América, el 7-VIII-1948. La entidad figura como establecida en el 126, East Lincoln Avenue, Rahway (New Jersey, EE. UU.). La patente, de invención, fue aprobada el 23-V-1949 y publicada el 16-VII-1949.

en la producción de penicilina por fermentación, consistente en que los microorganismos productores de penicilina empleados hasta finales de la década de 1940 originaban impurezas que coloreaban la mezcla de penicilinas producidas durante el proceso de fermentación; estas impurezas otorgan un color amarillo a la mezcla, por lo que es necesaria la purificación de las sales cristalizadas de bencil-penicilina por repetidos lavados con disolvente; estos lavados disminuyen grandemente los rendimientos totales de la bencil-penicilina.

Los autores mantienen que han obtenido ‘tipos mejorados de hongos’ productores de penicilina que, cuando son cultivados sumergidos en medios nutritivos aireados adecuados, son capaces de producir una cantidad de penicilina que prácticamente es el doble de la obtenida hasta ese momento. Este cambio en el resultado de la fermentación va acompañado por otras circunstancias ventajosas, como es que en la cantidad total de penicilina que los ‘tipos mejorados de hongos’ sintetizan en el caldo fermentado, la proporción de bencil-penicilina aumenta hasta llegar a un promedio del 80% e incluso más; es decir, la cantidad real de bencil-penicilina producida por estos ‘hongos mejorados’ es del orden de 2½ veces mayor que la producida por el mejor productor de penicilina en este momento conocido. Además, del empleo de estos tipos de ‘hongos mejorados’, como secretan pigmentos mientras ocurre la fermentación, se pueden obtener rendimientos económicamente mas favorables, pues se mejora el aislamiento de sales cristalizadas de bencil-penicilina mucho mejor que en caso de trabajar con otros hongos productores de penicilina.

Uno de los objetivos de esta patente es el de obtener medios de producción de penicilina por fermentación. Otro objetivo es el de modelar medios mejorados para incrementar la producción de bencil-penicilina, durante la fermentación, en condiciones sumergidas aireadas. Un tercer objetivo es el de diseñar procedimientos de fermentación para la producción de una mayor proporción de bencil-penicilina en la mezcla de penicilinas contenidas en el caldo fermentado. Aún se puede citar un cuarto objetivo, que es obtener procedimientos de fermentación que eviten la formación de pigmentos solubles por los organismos productores de penicilina durante su actividad fermentativa en condiciones sumergidas convenientemente aireadas, con lo cual se consigue una mayor recuperación de penicilina, en especial de las sales cristalizadas de bencil-penicilina.

Los autores informan que son particularmente útiles las series de *Penicillium crhysogenum* y, en particular, sus descendientes mutados. Este tipo de hongos se consigue por mutación y selección. La mutación puede ser artificial o natural; la selección implica la elección y el ensayo de tipos mutados para conocer la existencia entre ellos del estándar deseado. La memoria expone un procedimiento ilustrativo de la forma en que se obtuvo un tipo de hongo estándar: se experimentó con esporas del mutante *Penicillium crhysogenum* Q-176; las esporas se cultivaron en peptona-glucosa agar y se colocaron en una suspensión de agua estéril: a continuación fueron sometidas a una radiación ultravioleta producida por una lámpara esterilizadora ‘Westinghouse tipo 3B-WL782’ que presentaba su máxima intensidad a 2.537 Å. Las esporas se encontraban a una distancia de 200 mm. de esta fuente de radiación; la temperatura, durante toda la exposición, fue de 25° C; la duración de la exposición fue de una hora. Las esporas, después de este tratamiento, se recubrieron con placas de peptona-glucosa agar y se hicieron siembras a cultivos de agar inclinados de todas las colonias que desarrollaron las esporas supervivientes. Se determinó la productividad de penicilina de las nuevas colonias y, la que mostró una producción más elevada, se seleccionó para el tratamiento ulterior. Las esporas de esta colonia seleccionada se lavaron con agua

estéril, se filtraron a través de algodón y se irradiaron en una capa de poca altura en una cubeta de Petri abierta, con luz ultravioleta, durante un tiempo de ocho minutos. La luz fue producida por una lámpara ‘Hanovia tipo 16200’, colocada a una distancia de 100 mm. de la suspensión de las esporas; la temperatura de exposición siguió siendo de 25° C. Las esporas supervivientes se recubrieron con placas de dextrosa de patata y agar; se hicieron transferencias a cultivos de agar inclinados de esporas de todas las colonias que se desarrollaron. Las esporas de estos cultivos inclinados con una gran productividad de penicilina se irradiaron a continuación, en la forma últimamente citada. De esta tercera serie irradiada se seleccionó un tipo que tenía el estándar deseado, es decir, no poseía capacidad para secretar pigmentos en medios de fermentación pero sí la de sintetizar 80% de las penicilinas totales como bencil-penicilina y, además, la bencil-penicilina producida lo era en una cantidad superior a los dos tercios de un miligramo por mililitro de caldo fermentado. La memoria se complementa con algunos ejemplos sobre la actividad productora de penicilina en estos mutantes¹⁸⁴.

2.2.2.c. *Sustratos nitrogenados*

El 14 de septiembre de 1955, la empresa española *Antibióticos S.A.* presentó a registro un expediente para proteger un “Nuevo procedimiento de obtención de penicilinas por fermentación”¹⁸⁵.

Los autores de este procedimiento indican que, en sus trabajos de investigación, han comprobado que la fuente de nitrógeno utilizada como alimento por el microorganismo, para producir penicilina biosintética, no requiere alto grado de pureza; puede ser ‘corn streep’, hidrolizados de caseína o hidrolizados de residuos de matadero, tales como bazo, pulmón, hígado, etc., basta adicionarle una pequeña cantidad de ese mismo hidrolizado que ha sido previamente tratado con cloruro del precursor. Este nuevo compuesto añadido se combina con las proteínas y los aminoácidos contenidos en el ‘corn step’ y los aminoácidos hidrolizados, formando un complejo que no corresponde a una fórmula química definida y que es perfectamente aprovechado por el hongo para realizar la síntesis de la penicilina que se desee. Los autores ilustran este procedimiento con un ejemplo¹⁸⁶.

¹⁸⁴ Señalan los autores cuatro ejmplos, similares al siguiente que tomamos como tipo: se preparó un medio líquido formado por 30 g. de lactosa, 30 g. de sólidos procedentes del líquido de maceración del maíz, 1 g. de CaCO₃, 1 g. de fenil-acetil-etanol-amina, 3 g. de KH₂PO₄ y agua destilada para completar un litro. Se toman porciones de 60 ml. de este medio y se distribuyen en matraces Erlenmeyer de 250 ml. tapados con algodón; cada matraz contiene 0,25 ml. de aceite de soja. El contenido de los matraces se esteriliza y se inocula con esporas del mutante no secretor de pigmentos, pero gran productor de penicilina. Se preparan de la misma forma matraces inoculados con las esporas de *Penicillum chrysogenum* Q-176 secretor de pigmentos. La aireación se efectuó por agitación del contenido del matraz sobre un sacudidor rotativo a 220 r.p.m., a 24° C. Los promedios de varias fermentaciones, comparables entre sí, tras cinco días de actividad, fueron los siguientes

	U.I./ml.
<i>P. chrysogenum</i> Q-176 secretor de pigmento	540 U.I./ml.
<i>P. chrysogenum</i> Q-176 mutante no secretor de pigmento	1.660 U.I./ml.

¹⁸⁵ AHOEPM, patente 223.974; la memoria descriptiva consta de cinco hojas, escritas a máquina por una sola cara y firmadas, en Madrid, a 14-IX-1955. La empresa tiene su domicilio en Madrid. La patente, de invención, fue aprobada el 7-XI-1955 y publicada el 16-XII-1955.

¹⁸⁶ En un tanque de acero de unos 2.000 litros de capacidad, cerrado y provisto de mecanismo de agitación, aireación y dispositivo de enfriamiento, se depositan 1.400 litros de un medio de cultivo cuya composición es la siguiente: ‘corn steep liquor’ [licor de grano remojado] (5,6%), lactosa (2 g.), CaCO₃

En definitiva, se trata de un nuevo procedimiento de obtención de penicilinas por fermentación, caracterizado porque al caldo de fermentación se añade, como precursor, no el producto puro, sino un complejo resultante de tratar, con el cloruro del precursor, uno o varios sustratos nitrogenados.

2.2.3. Sales alcalinas de penicilina

Las sales de penicilina se fabricaron, de manera industrial, mediante un proceso en tres etapas:

- Fermentación, mediante la cual la penicilina es obtenida en un medio nutritivo por medio de hongos productores de ella, en especial *Penicillium notatum*.

- Aislamiento de la penicilina desde el medio nutritivo y su purificación posterior mediante adsorción o extracción, para obtener una solución de penicilina libre en un disolvente orgánico.

- Conversión de la penicilina libre en sales útiles terapéuticamente, extrayendo la penicilina del disolvente orgánico mediante una solución o suspensión acuosa de un reactivo alcalino, obteniéndose así la correspondiente sal de penicilina; a continuación se ha de congelar esa solución y desecarse al vacío en estado congelado, hasta conseguir un polvo seco.

Sobre estas etapas generales se desarrollaron un buen número de procedimientos destinados a mejorar algunas de ellas o a lograr, mediante métodos sencillos, aumentar la estabilidad del producto y mejorar su empleo como formas orales.

(0,24 g.), aceite antiespuma (0,33 g.) y agua c.s.p. hasta los 100 cm³; con un 'buffer' de fosfatos c.s.p. se ajusta el pH a 6, antes de la esterilización. Durante una hora el medio se esteriliza con vapor a 120° C; luego se enfría hasta los 24 ° C. Cuando está a esta temperatura se siembra con una suspensión de esporas de *Penicillium chrysogenum*. Se agita el medio, se mantiene a esta temperatura y se somete a una aireación intensa de unos 1.200 a 1.400 litros/minuto, durante 40-48 horas. Pasado este tiempo se siembra el contenido de este tanque en otro que previamente se ha cargado con 18.000 litros que contienen un medio de cultivo con la siguiente composición: 'corn steep liquor' (6%), lactosa (4,7 g.), CaCO₃ (0,8 g.), aceite antiespuma (0,2 g.) y agua c.p.s. hasta 100 cm³. Después se adicionan, previa esterilización por calefacción a 150° C, durante media hora y siguiendo para la adición una técnica aséptica, 180 litros de 'corn steep' tratado con cloruro de fenoxiacetilo en la siguiente forma: en un tanque de acero inoxidable, provisto de mecanismos de agitación y de refrigeración, se introducen 100 kg. de 'corn steep liquor', que serán disueltos en 175 kg. de agua; la mezcla se enfría a 4°-5° C y se basifica hasta un pH 8,5-9 con sosa 5 N; a continuación se añaden 55 kg. de cloruro fenoxiacetilo, seguidos de 225 litros de sosa 2,5 N, que se añaden en varias fracciones en un tiempo de dos horas, agitando fuertemente. La agitación se continúa durante dos horas; al cabo de este tiempo se añade ácido clorhídrico 5 N, hasta conseguir una reacción ácida fuerte, se agita cuatro veces adicionando 20 litros de éter cada vez. Los extractos etéreos se evaporan a sequedad al vacío y el residuo se disuelve en 200 litros de acetato de etilo y precipita con 200 litros de éter de petróleo. El aceite separado se añade a la solución acuosa que queda en el tanque y se ajusta el pH a 6,5 con una solución de sosa 5 N. De la misma forma se tratarían, en su caso, los hidrolizados de caseína, hígado o residuos de matadero, en el supuesto de ser ellos los empleados para la alimentación del hongo. La fermentación ha de continuar durante un tiempo de 100 a 130 horas, presentando el 'caldo' un rendimiento de 1.800-2.000 U.I./cm³, de las cuales un 70% (e incluso porcentajes mayores) son debidas a la fenoximetil-penicilina que contiene. El aislamiento de la fenoximetil-penicilina que hay en el 'caldo' puede hacerse por las técnicas normales de extracción de la penicilina G con alguna variante de detalle que no afectan a lo fundamental del proceso. En este método operativo pueden utilizarse también otros cloruros para el tratamiento del 'corn steep' o de los hidrolizados, por ejemplo cloruro de p-hidroxifenilacetilo o de fenacetilo que, al reaccionar con las proteínas o aminoácidos en la forma descrita, constituyen excelentes precursores para la formación de penicilina X o p-hidroxifenil-penicilina y de la penicilina G, en el caso del cloruro del ácido fenilacético.

2.2.3.a. Producción de sales alcalinas

El 17 de julio de 1946 se presentó, en el registro español de patentes, el expediente promovido por la empresa norteamericana *Hoffmann-La Roche Inc.* para proteger “Un procedimiento de preparar sales de penicilina de metales alcalinos y alcalinotérreos”¹⁸⁷.

Los autores señalan que, si bien el proceso de fabricación de penicilina entonces conocido [1946] era satisfactorio para operaciones en gran escala en lo referente a las operaciones de fermentación y aislamiento de la penicilina desde el medio nutritivo, no era así a partir del estado congelado, donde deben secarse volúmenes grandes de la solución acuosa final de la sal de penicilina, en especial cuando se prepara la sal de calcio. Para superar estas dificultades se propuso el empleo del calentamiento dieléctrico, como proceso suplementario para poder reducir la carga en la desecación final desde el estado congelado¹⁸⁸; después del calentamiento dieléctrico, se realiza una desecación final de la solución concentrada de penicilina en estado congelado.

De acuerdo con el procedimiento descrito en esta patente, las sales alcalinas y alcalino-térreas de penicilina son preparadas cuando reacciona la penicilina, disuelta en un disolvente orgánico prácticamente anhidro, con un compuesto, también orgánico, de un metal alcalino o alcalino-térreo. La penicilina disuelta en el disolvente orgánico y el compuesto órgano-metálico reaccionan entre sí para formar la correspondiente sal de penicilina. Para que los resultados sean óptimos es necesario usar cantidades estequiométricamente equivalentes de compuestos órgano-metálicos.

Si la sal de penicilina fuese insoluble en la mezcla de reacción, la sal es separada por filtración, se lava y se libera del disolvente, por secado, en una estufa de vacío. Si la sal de penicilina es soluble en la mezcla, para precipitarla se añade un segundo disolvente en el cual la sal de penicilina tiene baja solubilidad. Otra posible forma de obtener la sal es concentrando o secando la solución resultante de sal de penicilina.

Como se ha indicado, la solución inicial de penicilina en un disolvente orgánico debe ser anhidra, por lo tanto, si es preciso, la solución se somete a un proceso desecador mediante el uso de un agente secador, como por ejemplo sulfato sódico anhidro, o por separación del agua por destilación azeotrópica.

En la memoria se consigna una relación de los disolventes que pueden emplearse, solos o en mezclas, para la solución inicial de penicilina¹⁸⁹; también se citan

¹⁸⁷ AHOEPM, patente 174.340; la memoria consta de 21 hojas escritas a máquina por una sola cara; quedó firmada el 17-VII-1946. Este expediente se corresponde con el presentado en Estados Unidos de América, el 19-VII-1945, con número de registro 606.024/45. La empresa hace figurar, como domicilio, Roche Park, Nutley (New Jersey, EE. UU.). La patente española, de invención, fue concedida el 3-IX-1946 y publicada el 1-X-1946.

¹⁸⁸ En la memoria se alude al estudio de Earl W. FLOSDORF. “Drying penicillin by sublimation in the United States and Canada”. *The British Medical Journal*, 1: 216-218. Londres, 1945, aparecido el 17 de febrero de 1945.

¹⁸⁹ Son éstos: ésteres (acetato de etilo, acetato butílico, acetato isopropílico, acetato amílico, acetato bencílico, butirato etílico, benzoato etílico, malonato dietílico, éster etílico del ácido furoico), quetonas (acetona, ciclohexanona, ciclopentanona, etil-metil-quetona, metil-isobutil-quetona, dietilquetona, acetofenona), hidrocarburos halogenados (cloroformo, tetracloruro de carbono, bicloruro etilénico, clorobenzol, bromuro etílico), éteres, con inclusión de los éteres cíclicos (éter dietílico, éter dibutílico, éter di-isopropílico, dioxano, tetrahidrofurano), alcoholes, con inclusión de los alcoholes éteres (alcohol isopropílico, alcohol amílico, alcohol butílico, ciclohexanol, ciclopentanol, alcohol tetrahidrofurfurílico), nitrilos (acetonitrilo, benzonitrilo, propionitrilo), hidrocarburos (benzol, toluol,

ejemplos de compuestos órgano-metálicos para el tratamiento de la solución de piridina¹⁹⁰. En ambos casos se ofrece un amplio abanico de posibilidades; lo mismo puede decirse de los disolventes empleados para la penicilina; prácticamente es posible utilizar todo aquel disolvente orgánico en el cual ésta sea soluble.

Para fines de esta reacción, se puede emplear todo compuesto órgano metálico (de metal alcalino o alcalino-térreo) más o menos soluble. Estos pueden ser: sales metálicas de ácidos orgánicos, alcoholatos como el isopropilato sódico y los correspondientes derivados del hexanol, o fenolatos como el fenolato sódico, guayacolato sódico, naftóxido sódico y ésteres del ácido salicílico de metales alcalinos y alcalino-térreos.

En el proceso industrial de la fabricación de la penicilina, desde el punto de vista práctico, hay que considerar la solubilidad, disponibilidad y coste de los productos que se manejan. Por ese motivo se prefieren los derivados de compuestos orgánicos de metales alcalinos o alcalinotérreos que tengan al menos un átomo de hidrógeno activo unido a un átomo de carbono, por ejemplo derivados metálicos de compuestos orgánicos que tienen la estructura de beta-queto-éster, 1,3-ciano-carbalcoxi, 1,3-ciano-carbonilo o 1,3-dicarbonilo¹⁹¹.

Este nuevo método presenta, según sus autores, las siguientes características: producción rápida, disminución de los gastos de explotación y de conservación, reducción del espacio necesario para realizar el proceso, sencillez de los aparatos utilizados, no es necesario el control de las bajas temperaturas y del alto vacío, uso de

xilol, ciclohexano) y queto-ésteres (acetoacetato etílico, acetoacetato butílico, 2-carbetoxi-ciclohexanona-1, 2-carbetoxi-ciclopentanona-1, éster metílico del ácido levulínico, éster etílico del ácido levulínico).

¹⁹⁰ Estos ejemplos son los siguientes: butóxido sódico en alcohol butílico, butóxido sódico en ciclohexanol, isopropóxido potásico en alcohol isopropílico, malonato dietil cálcico en acetato butílico, malonato dietil-cálcico en acetato amílico, malonato dietil cálcico en metil-isobutil-quetona, malonato dietil cálcico en acetato butílico, malonato dietil sódico en acetato isopropílico, malonato dietil sódico en ciclohexanol, malonato dietil potásico en acetato amílico, malonato dietil cálcico en ciclohexanol, malonato dietil magnésico en acetato butílico, malonato dietil magnésico en metil-isobutilquetona, malonato dietil magnésico en ciclohexanol, malonato dietil magnésico en toluol, acetoacetato etil sódico en acetoacetato etílico, acetoacetato etil cálcico en acetoacetato etílico, acetoacetato etil cálcico en acetato butílico, acetoacetato etil sódico en acetato butílico, acetoacetato etil sódico en cloroformo, acetoacetato etil cálcico en cloroformo, acetoacetato etil cálcico en éter, acetoacetato etil cálcico en benzol, acetoacetato etil sódico en benzol, acetilcetona sódica en acetato butílico, acetilacetona sódica en cloroformo, acetilacetona cálcica en acetato amílico, 2-carbetoxi-ciclohexanona-1 sódica en acetato butílico, fenolato sódico en acetato butílico, fenolato potásico en alcohol butílico, isopropilato sódico en acetato butílico, 2-carbetoxi-ciclohexanona-1 potásica en acetato butílico, 2-carbetoxi-ciclopentanona-1 potásica en metil-isobutil quetona, acetoacetato etil estróncico en acetoacetato etílico, acetoacetato etil lítico en acetoacetato etílico y malonato dietil-lítico en acetato butílico.

¹⁹¹ Los compuestos usados con preferencia son los derivados metálicos alcalinos y alcalinotérreos de ésteres etílico, dietílico o dibutílico, los correspondientes ésteres de ácidos malónicos monosustituídos, como el ácido metilmalónico o etilmalónico, ésteres del ácido acetoacético, ésteres del ácido alfa-metil-acetoacético, ácido gamma-metil-acetoacético, ácido alfa,gamma-dimetil-acetoacético, ésteres del ácido ciano-acético, ácido-alfa-ciano-propiónico y ácido ciano-succínico; 2-ciano-ciclohexanona-1, 2-ciano-ciclopentanona-1, alfa-ciano-acetofenona y alfa-ciano-acetona, ciclohexano-1,3 diona, acetil-acetona, alfa-metil-acetil-acetona, gamma-metil-acetil-acetona y benzoil-acetona. Los autores de la memoria incluyen algunos ejemplos para ilustrar procesos específicos con los que obtener sales de penicilina mediante el proceso general que ha quedado expuesto; es conveniente resaltar que, en aquellos casos en los que la sal de penicilina es soluble en la mezcla de reacción, puede hacerse uso de la concentración, llegando incluso a la sequedad de la mezcla para obtener la sal. Este procedimiento permite la preparación de sales de metales alcalinos y alcalinotérreos (sales de sodio, potasio, magnesio, litio, estroncio, bario y calcio), origen de muchos desarrollos posteriores.

un equipo relativamente barato y de fácil adquisición, facilidad operativa, alto rendimiento de la sal de penicilina y gran potencia y estabilidad del producto obtenido.

Con fecha 9 de noviembre de 1949, la empresa norteamericana *Schenley Industries* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger “Un método para la producción de penicilina sódica”¹⁹², referido a la preparación de sales sódicas puras e incoloras de penicilina a partir de sales de base orgánica de penicilina¹⁹³.

Las sales de base orgánica no son formas aceptables para la administración terapéutica de penicilina, y hasta el momento de esta invención [1949], no se había desarrollado la conversión, salvo por extracción con disolventes, de tales sales de base orgánica en las sales sódicas de penicilina, que son las formas terapéuticas aceptables. Los autores proponen que, en ciertas condiciones, las sales básicas de penicilina pueden reaccionar directamente con las sales sódicas de ácidos orgánicos para originar sales sódicas de penicilina de un alto grado de pureza. El procedimiento se realiza por una reacción de doble descomposición en una solución de disolvente orgánico, reacción que se puede representar según el siguiente esquema:

Sal de base orgánica de penicilina + Sal de sodio reactiva \rightleftharpoons Penicilina sódica
[producto precipitado] + Sal de base orgánica [subproducto soluble]

Como sal de base orgánica de penicilina pueden emplearse sal de trietil-amonio ciclo-hexilamina, sal de N-etil-morfolina, sal de N-etil-hexahidro-2,6-lutidina o sal de bencil-amina. Las sales de sodio reactivas que pueden utilizarse son del tipo de tiocianato de sodio, clorato de sodio, perclorato de sodio, diversos fenoles sódicos o yoduro de sodio. Como disolventes adecuados se pueden emplear líquidos orgánicos clorados, como dicloruro de metileno o cloroformo; cetonas, como acetona o butanona; alcoholes alifáticos monovalentes inferiores (con 1 a 5 átomos de carbono), tales como metanol, etanol, propanol, n-butanol y diversos alcoholes amílicos.

La reacción descrita puede realizarse en una amplia gama de temperaturas, por ejemplo entre -10° C y + 40° C; no obstante, es conveniente trabajar a la temperatura ambiente, por ejemplo entre 15° C y 25° C, pues a esta temperatura la sal de base orgánica y la sal sódica reactiva son solubles en medida conveniente en sus respectivos disolventes y el producto final, es decir la penicilina sódica, no es excesivamente soluble en la mezcla de reacción.

¹⁹² AHOEPM, patente 190.143; la memoria descriptiva consta de 17 hojas mecanografiadas y escritas por una sola de sus caras; como domicilio de la empresa figura 350 Fifth Avenue, Nueva York (EE. UU.). La memoria, firmada en Madrid el 9 de noviembre de 1949, se corresponde con la solicitud presentada en EE. UU. el 23 de octubre de 1948, bajo el número 56.253/48. La patente española fue concedida el 12-XI-1949 y publicada en 1-I-1950.

¹⁹³ Según relatan los autores de la memoria, la penicilina se separaba de los caldos de fermentación y de las soluciones acuosas por absorción, sobre carbono activo y/o por extracción con otros disolventes, como por ejemplo cloroformo. A partir de estas soluciones se formaban las sales alcalinas o alcalino-térreas de penicilina, al poner en contacto estas soluciones con otras de los hidróxidos correspondientes. La fase acuosa obtenida podía separarse y secarse para obtener así sólidos que consistían en sales no cristalizadas de penicilina con ciertas impurezas. Estos preparados eran de color amarillo o naranja y con una potencia de 500 U.I. a 1.000 U.I./mg., lo cual indica que las impurezas se encontraban en una proporción del 40% al 70%, pues la penicilina sódica pura (penicilina G) tiene una potencia de 2.667 U.I./mg.

Es conveniente usar una solución en esencia saturada de sal de base orgánica en el disolvente elegido, de modo que se reduzca al mínimo la pérdida de producto debido a la solubilidad¹⁹⁴. La solución de sal sódica reactiva puede emplearse también sobre una gama bastante amplia de concentraciones, normalmente es preferible usar una solución saturada de la sal sódica reactiva en el disolvente elegido, de modo que el volumen de la solución del reactivo se mantenga bajo, de forma que se reduzca al mínimo la pérdida del producto de reacción debido a su solubilidad en los líquidos empleados¹⁹⁵. Algunas sales sódicas que se usan como reactivos poseen solubilidades limitadas en determinados disolventes, por lo que algunas veces es conveniente aumentar esta solubilidad añadiendo un poco de agua al disolvente empleado, pero demasiada cantidad en la mezcla de reacción perturba la precipitación de la sal sódica producida.

La sal de base orgánica de penicilina que se utiliza como material de partida para este procedimiento no precisa tener un grado determinado de pureza. Cuando las sales reactivas reaccionan con las sales de base orgánica de penicilina, en las condiciones dichas, se produce la precipitación de la penicilina sódica, que puede ser separada de la masa de reacción por filtración, centrifugación u otros medios adecuados. Cuando los cristales de penicilina sódica se separan de la masa de reacción es conveniente lavarlos, de modo que se eliminen las impurezas adherentes; usualmente se prefiere lavar los cristales con disolvente, a fin de eliminar la sal reactiva en exceso que pudiera estar presente, luego se lava con acetona, para aclarar el secado del producto final.

Este método ofrece como resultado una precipitación de las sales sódicas de bencil-penicilina desde la mezcla de reacción; la concentración de bencil-penicilina que puede obtenerse en el producto de penicilina sódica depende del contenido en bencil-penicilina de la sal de base orgánica empleada como material de partida para el procedimiento.

2.2.3.b. Mezcla con grasas: aumento de la estabilidad

Cuando la penicilina se administra por vía oral, gran cantidad de ella es destruida por los ácidos del estómago; la absorción de penicilina en el torrente circulatorio es pequeña y no alcanza los niveles terapéuticos. Para conseguir un efecto deseable se necesitaría una cantidad excesiva de penicilina y, aunque se consiguiese, la cantidad de ella disminuye muy rápidamente en el torrente circulatorio. Como la penicilina administrada por vía bucal se destruye en gran cantidad en el estómago, se intentó encerrarla en una cápsula o píldora con revestimiento entérico; pero este revestimiento suele fallar en el estómago y la penicilina se destruye, o la capa entérica no se disuelve lo bastante pronto después de salir del estómago y la penicilina no se descarga en las porciones superiores del tubo intestinal desde las cuales puede ser absorbida. Por lo tanto, este método no resultaba satisfactorio.

¹⁹⁴ Son adecuadas las concentraciones de 200-400 g. de sales de las bases orgánicas de penicilina, por litro de disolvente clorado, según los autores de esta memoria.

¹⁹⁵ En este procedimiento pueden usarse disolventes anhidros o disolventes que contengan hasta 10% de agua en volumen. Las soluciones de sal sódica reactiva pueden variar desde los 10 g. a los 300 g. por litro de disolvente.

En septiembre de 1944 Monroe J. Romansky y George E Rittman hicieron público un método para prolongar la acción de la penicilina, rápidamente aceptado¹⁹⁶; estos autores propusieron el uso de penicilina cálcica suspendida en una mezcla de aceite de sésamo o cacahuete, con un 4,8% de cera blanca de abejas; con ello se logró que la aplicación de la penicilina se espaciase a 12 horas para dosis de 300.000 U.O. y a 24 horas para las de 600.000 U.O., un procedimiento conocido, desde entonces, como ‘fórmula Romansky y Rittmann’.

El 11 de diciembre de 1945 entró en el registro español de patentes un expediente, promovido por *American Cyanamid Company*, para proteger, mediante patente de invención por veinte años, “Un procedimiento de preparar una composición terapéutica con penicilina”¹⁹⁷. Se trata de un producto que contiene penicilina y un derivado de penicilina estable y terapéuticamente activo¹⁹⁸, disuelto en un aceite o grasa asimilable pero insoluble en agua¹⁹⁹; también ofrece esta misma composición, de penicilina y un derivado de penicilina estable, revestida de un material entérico y dispersa en aceite o grasa insoluble en agua y similares. De acuerdo con los promotores, se han obtenido buenos resultados cuando la composición contiene entre 66.550 U.O. a 400.000 U.O. de dichos derivados de penicilina por cada cm³ de aceite o grasa. La composición se debe administrar preferentemente en cápsulas de gelatina.

Una forma preferente de esta patente es la composición de una sal de penicilina insoluble en aceite, dispersa en uno de los tipos de aceite utilizables. La sal de penicilina se encuentra en forma de partículas discretas rodeadas por una sustancia grasa o aceite; como el agua tiende a alterar la penicilina, es deseable que la preparación sea anhidra.

La cantidad de sal de penicilina en relación con el aceite puede variar entre grandes márgenes. Es muy práctico que la proporción de la sal de penicilina se regule de manera que 1 cm³ de la composición contenga de 5.000-50.000 U.O. de penicilina; es decir, cada gramo de esta composición tendrá entre 10-100 mg. de sal de penicilina comercial, que tiene, para las fechas en que se patenta esta invención [1945], aproximadamente 500 U.O./mg. Cuando se usa una sal de penicilina de menor potencia terapéutica se necesitan tomar dosis más grandes, e inversamente, cuando se usa una de mayor potencia se necesita menor dosis. La composición puede contener más o menos

¹⁹⁶ Monroe J. ROMANSKY, George E RITTMAN. “A method of prolonging the action of penicillin”. *Science*, 100(2592): 196-198. Washington DC, 1944; [Editorial]. “Prolonging the action of penicillin”. *Journal of the American Medical Association*, 126(7): 435. Chicago, 1944; Kenneth E. GAMM. “Penicillin therapy in pyelophlebitis”. *Journal of the American Medical Association*, 128(16): 1159-1161. Chicago, 1945; [Editorial]. “Combined Sulfonamide and Penicillin Therapy”. *The New England Journal of Medicine*, 235: 562-563. Boston, 1946.

¹⁹⁷ AHOEPM, patente 171.813; la memoria descriptiva consta de veintiuna hojas escritas por una sola cara; queda firmada el 11-XII-1945. La empresa figura establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York (EE. UU.). La patente española, en la modalidad de invención, fue concedida el 9-IV-1946 y publicada el 16-V-1946.

¹⁹⁸ Los derivados de penicilina estables y terapéuticamente activos pueden ser una o más de las sales o ésteres conocidos, por ejemplo: las sales metálicas o amónicas de sodio, potasio, magnesio, bario, amonio, aluminio, así como de otros metales alcalinos o alcalinotérreos, con penicilina; o bien un éster de los mismos, como el éster acetílico, el éster glicérico o similares.

¹⁹⁹ El aceite o grasa, asimilable e insoluble en agua, puede ser uno o más de los aceites o grasas corrientes de pescado o vegetales, se pueden citar: aceite de pescado, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de cereales, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de hígado de tiburón, aceite de esperma, tocino, mantequilla, así como cualquier otro glicérido digerible.

penicilina, siempre y cuando tenga suficiente aceite para envolver por completo en su interior cada partícula discreta de la sal.

Para preparar una composición del tipo que se ha descrito se puso una cantidad de sal sódica de penicilina en un mortero y se cubrió dicha sal con aceite de semillas de algodón; la sal de penicilina empleada contenía aproximadamente 500 U.O./mg. Se trituró para conseguir una dispersión uniforme en el aceite de la sal de penicilina insoluble. El material se colocó en cápsulas de gelatina. Al cabo de tres meses se analizó el producto obtenido y se observó que no había perdido prácticamente nada de su actividad terapéutica, ello permitió considerarlo como un producto estable.

Se hicieron ensayos con perros, suministrándoles por la boca cantidades adecuadas de la preparación así preparada²⁰⁰; se experimentó con una serie de productos en los cuales variaba la proporción de aceite y penicilina. Periódicamente se tomaron muestras de la sangre de los animales para analizarlas²⁰¹; los resultados pusieron de manifiesto que una pequeña cantidad de aceite protegía la sal de penicilina contra su destrucción por los ácidos del estómago y prolongaba su absorción en el torrente sanguíneo. Se fabricaron y ensayaron otros preparados que contenían más aceite en proporción con la cantidad de penicilina; se comprobó que el aceite en exceso disminuye la absorción en medida imprudente y se pierden los efectos obtenidos al usar cantidades menores de aceite²⁰². Los resultados experimentales mostraron que hay un límite crítico entre la porción de aceite y la del derivado de penicilina, obteniéndose buenos resultados operativos cuando la composición usada contiene 0,3 cm³ de aceite por 40.000 U.O. del derivado de penicilina; los resultados son aún mejores cuando la composición contiene de 0,1 cm³ a 0,6 cm³ de aceite por 40.000 U.O. del derivado de penicilina.

Una de las principales ventajas de este procedimiento es la posibilidad de utilizar una penicilina relativamente impura y, por lo tanto, no queda bien determinado el peso total de penicilina en la composición. Los autores señalan que, si se usa un derivado impurificado que contenga 500 U.O., el campo crítico varía desde unos 0,133 g. a 0,800 g. de sal de penicilina por cada cm³ de aceite; si es utilizado un derivado de penicilina de potencia mayor el peso disminuirá e, inversamente, si el tipo de derivado es más impuro el peso aumentará.

²⁰⁰ El hecho de que los animales de experimentación fuesen perros es debido a que en su estómago contiene una gran cantidad de ácido; a pesar de ello se comprobó que, en el torrente sanguíneo del animal, se mantenían niveles terapéuticos de penicilina.

²⁰¹ En un primer grupo de perros de experimentación se dieron dosis de 40.000 U.O. de penicilina en agua; se les extrajo la primera muestra sanguínea al cabo de una hora, se anotó un promedio de 0,18 U.O./cm³ en sangre. Se tomaron muestras de sangre en varios intervalos, los resultados mostraron una disminución del contenido de penicilina en la sangre, al cabo de 4 horas y 45 minutos la concentración de la penicilina en la sangre era de 0,01 U.O./cm³. Esta concentración está próxima a los niveles considerados terapéuticos.

²⁰² Se comenzó ensayando preparaciones que contenían 0,3 cm³ de aceite de semillas de algodón por cada 40.000 U.O. de sal de penicilina; se observó que se obtenían niveles terapéuticos adecuados de penicilina y estos niveles se mantenían en un período de tiempo mayor que en los casos anteriores; así, al cabo de 7 horas y 15 minutos, el torrente sanguíneo del animal aún contenía 0,01 U.O./cm³.

Los investigadores demostraron la eficacia de la composición en el hombre²⁰³, concluyendo que esta composición es adecuada para establecer y mantener, en largos períodos de tiempo, un nivel terapéutico de penicilina en sangre.

Una modificación de este método consiste en una solución de un derivado de penicilina soluble en aceite o sustancia grasa comestible que sea insoluble en agua; es preferible que el derivado de penicilina sea insoluble en agua, de forma que no sea extraído de la composición por los fluidos acuosos del estómago. Otro modo de preparar esta composición es en forma de emulsión; el derivado de penicilina, que es insoluble en agua, se disuelve o se suspende en aceite o grasa comestibles insolubles en agua; el aceite se dispersa en una solución acuosa de gelatina o compuesto similar soluble en agua. La composición puede moldearse en unidades adecuadas para el uso.

Todas estas composiciones pueden administrarse directamente y mezclarse con excipientes, agentes aromatizantes y, en general, con toda aquella sustancia que favorezca su uso y sea farmacológicamente inactiva. La forma de presentación puede ser variada: cápsulas de gelatina, tabletas o píldoras; éstas pueden revestirse con azúcar, gelatina o cualquier sustancia inerte soluble en agua; también pueden cubrirse con un revestimiento entérico insoluble en aceite, aunque -según señalan los autores- los productos con revestimiento entérico no son siempre seguros²⁰⁴.

²⁰³ Para ello preparó una composición formada por 90.000 U.O. en aceite de semillas de algodón, de la forma ya conocida. Esta composición se administró a un hombre de 86 kg., por vía oral; una hora después de la toma, el nivel de la penicilina en la sangre resultó ser aproximadamente de 0,05 U.O./cm³; en el torrente sanguíneo se mantuvieron niveles terapéuticos de 0,30 U.O., o más altos, durante un período de más de 4 horas después del administración de la composición de penicilina.

En otro grupo de experimentación se administraron 90.000 U.O. en aceite, al cabo de 3 y 6 horas se dieron dosis de 20.000 U.O.; tras una hora el nivel de penicilina en la sangre era de 0,07 U.O./cm³, pasadas tres horas la sangre aún tenía una cantidad de penicilina terapéuticamente activa. Después de la segunda dosis de 20.000 U.O. el nivel de sangre aumentó, demostrando que con esa pequeña dosificación la composición se puede tomar por boca para mantener un nivel terapéutico de la penicilina en sangre. La segunda dosis de 20.000 U.O. se administró una hora después de una comida abundante, se comprobó que una porción importante de la penicilina fue absorbida por el torrente circulatorio.

²⁰⁴ Aunque la forma más adecuada sea en cápsulas de gelatina, puede tomarse también como líquido en una botella de volúmenes medidos. Las cápsulas se revisten de una capa de aceite, tienen un aspecto poco atractivo, son de manejo desagradable y antihigiénico; esto es debido a que las pequeñas partículas del derivado de la penicilina, incluso cuando están revestidas de aceite, son higroscópicas y extraen agua de la capa de gelatina. Cuando el agua es extraída por el derivado de la penicilina, desde la parte externa de la cápsula, se originan diminutos orificios por los cuales sale el aceite, aunque los orificios son de tamaño pequeño y la cantidad de aceite que se expele no es grande, el trastorno que se produce debe ser corregido para poder comercializar el producto. Si el derivado de penicilina se mezcla con goma, laca o un material de revestimiento entérico similar y las partículas discretas individuales del derivado de penicilina se incorporaban al aceite, es posible presentar el producto en cápsulas, eliminándose el trastorno debido a las 'cápsulas rezumantes'. La goma laca tiene una acción entérica y retrasa la liberación de la penicilina, por lo que se puede usar un margen más amplio de aceite en proporción al derivado de penicilina que el señalado líneas arriba: de 0,1 cm³ a 0,6 cm³ de dicho aceite o grasa por cada 40.000 U.O.; cuando el producto tiene más de media parte en peso de goma laca por cada parte en peso del derivado de penicilina, el revestimiento de goma laca es tan grueso que resiste la acción de los fluidos en el estómago y del tubo intestinal superior; ello origina que no se disuelva la cápsula y la penicilina no quede libre en la parte del cuerpo en la cual debía ser absorbida en el torrente sanguíneo. Es recomendable que el producto no contenga más de media parte en peso de la goma laca por cada parte de derivado de penicilina. Según disminuye la porción de goma laca aumenta la eficacia terapéutica del producto hasta que alcanza el óptimo que, aproximadamente, es de 1/8 de la parte en peso de la goma laca por una parte en peso del derivado de penicilina. No se debe olvidar que, conforme disminuye la proporción de goma laca, aumenta el peligro de que ocurra un daño en la cápsula de gelatina por acción higroscópica de la penicilina. Dada la acción protectora del revestimiento entérico sobre las partículas de penicilina, es posible incorporar plastificadores y otros modificadores a la cápsula de gelatina o al

El 19 de febrero de 1948, la empresa norteamericana *The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.* presentó, ante la Administración española, una solicitud de patente de invención por veinte años para “Un procedimiento para la obtención de preparaciones para la terapéutica por penicilina”²⁰⁵. Su propuesta es una composición farmacéutica estable, formada por calcio-penicilina, en un vehículo anhidro de cera y aceite de cacahuete muy refinado²⁰⁶. La forma de lograr este producto es incorporando un vehículo caliente anhidro, constituido por cera en aceite de cacahuete, a la calcio-penicilina pulverizada²⁰⁷; con ello se logra una composición farmacéutica que posee los componentes deseados y que es capaz de producir y mantener, durante largo tiempo, niveles elevados de penicilina, siendo además más estable que las composiciones antes disponibles.

Para conseguir esos preparados farmacéuticos, se calienta un aceite altamente refinado de cacahuete²⁰⁸, a una temperatura comprendida entre 40° y 45° C. La cera, blanqueada y esterilizada, se calienta aparte a una temperatura de 50° a 55° C, hasta conseguir que forme un líquido claro²⁰⁹; en ese momento se mezcla con ella el aceite caliente de cacahuete. La mezcla íntima, estando fundidos los componentes de ella, puede favorecerse agitando en un depósito caliente o por medio de un mezclador mecánico. El derivado de la penicilina, la calcio-penicilina, se debe colocar en un agitador mecánico en estado pulverizado y, a continuación, se añade la mezcla clara y líquida de cera y aceite de cacahuete, a una temperatura de 50° a 55° C. La mezcla se sigue realizando hasta conseguir una suspensión homogénea; luego se enfría, quedando

contenido de la cápsula: excipientes, agentes aromatizantes, aglutinantes, preservativos, condensantes - como etilcelulosa, goma de acacia o aceites hidrogenados-, agentes emulgentes, materia colorante, etc.

²⁰⁵ AHOEPM, patente 182.483. La memoria descriptiva consta de diez hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 19-II-1948. La empresa figura como residente en Baltimore (Maryland, EE.UU.), en el 111 East Redwood Street. La patente española fue concedida el 20-II-1948 y hecha pública el 16-IV-1948.

²⁰⁶ Ensayando aceites de sésamo y de avena para lograr una acción prolongada de la penicilina, se descubrió que, con ellos, se han de emplear grandes cantidades de cera para conseguir la prolongación de la acción de la penicilina y estas grandes cantidades producen, en el producto final, una viscosidad tan elevada que no resulta práctico el empleo de estas mezclas.

²⁰⁷ Dentro de los derivados de penicilina se prefiere el cálcico, pues forma mezclas más homogéneas y estables con el vehículo de aceite de cacahuete y de cera. El derivado sódico de penicilina origina una suspensión granular con el vehículo citado y, como tiene carácter higroscópico, produce mezclas inestables; además, los niveles sanguíneos producidos por mezclas de sodio-penicilina son erráticos y no tienen una duración tan prolongada como las mezclas de calcio-penicilina.

²⁰⁸ El aceite de cacahuete empleado está muy refinado, apenas tiene humedad (menor del 0,05%) y está exento de sustancias fácilmente oxidables. Antes de mezclarlo se debe esterilizar; se consigue esto por medio de un filtro Seitz (formado por capas de asbesto), pasándolo después a través de un filtro constituido por seis capas de gasas estériles o por un filtro de vidrio concrecionado, y calentando después con aceite. Esta última fase se realiza introduciendo el aceite de cacahuete en un autoclave a una presión de vapor de 17 libras [*sic*] durante unos 20 minutos.

²⁰⁹ La cantidad de cera que se ha de emplear en el preparado viene condicionada a la viscosidad con relación al producto final. Se obtienen resultados favorables con vehículos de aceite de cacahuete y cera en los cuales el contenido de cera está comprendido desde 0,60% a 4,80%; si se supera el límite superior de contenido en cera, los productos obtenidos son demasiado viscosos para el uso práctico y, además, no se consigue efecto alguno sobre la prolongación de la acción de la penicilina. El contenido óptimo de cera se halla entre 3,2% y 2,8 % en peso; dentro de estos límites puede variarse la cantidad según la actividad del derivado de penicilina empleado.

suficientemente líquida para que pueda tomarse de un frasco tapado con caucho mediante una aguja de calibre adecuado.

Puede emplearse calcio-penicilina de cualquier potencia, siendo deseable utilizar el producto de la mayor disponible, para conseguir elevados niveles sanguíneos durante períodos de tiempo lo más largos posibles. Las preparaciones de calcio-penicilina en un vehículo de cera y aceite de cacahuete en dosis de 300-500, 600-800 y 900-1.000 U.O./mg. son las composiciones de penicilina más satisfactorias, de acuerdo con los autores de esta memoria. La cantidad máxima de penicilina que puede suspenderse en aceite de cacahuete y cera, que resulta satisfactoria en cuanto a la viscosidad que presenta y que tenga una acción terapéutica prolongada, es aproximadamente de 300 mgr/cm³. Los autores de la memoria mantienen que se absorbe una cantidad relativamente constante de penicilina por cada centímetro cúbico de mezcla de calcio-penicilina, cera y aceite de cacahuete y que aumentando la dosis sólo se logra una ligera prolongación adicional²¹⁰; de ello proporcionan algunos ejemplos prácticos²¹¹.

Una dosis única diaria de 300.000 U.O., contenida en un centímetro cúbico de tal preparación, mantiene en la sangre un nivel de penicilina durante 24 horas capaz de combatir prácticamente todas la infecciones, excepto las muy fuertes. En los individuos cuyo peso sea de 100 libras o menos²¹², sus niveles adecuados de la penicilina en la sangre durante 24 horas se consiguen con una dosis de 200.000 U.O. Si la infección fuese extremadamente grave, se pueden proporcionar dosis de 300.000 U.O. en un centímetro cúbico, a intervalos de 12 horas, para mantener la sangre con un nivel continuo de penicilina de 0,312 a 1,25 U.O./cm³ de sangre. Para alcanzar niveles extraordinariamente elevados de penicilina en sangre se emplean inyecciones intramusculares de 2, 3 y 4 cm³ de calcio-penicilina en un vehículo de 4% en peso de cera en aceite de cacahuete conteniendo un total de 600.000, 900.000 y 1.200.000 U.O. respectivamente, aunque materialmente no se prolonga la duración de la acción de la penicilina; estas inyecciones originan en la sangre máximos de penicilina de 2,5 a 10 U.O./cm³ de 1 a 10 horas después de la inyección; durante un tiempo de, al menos, 24 horas después de la inyección se mantienen, en la sangre, niveles de penicilina de 0,039 a 0,078 U.O./cm³; la penicilina aún se sigue eliminando por la orina 144 horas después de las inyecciones.

Estas preparaciones farmacéuticas pueden emplearse para tratar infecciones gonocócicas, neumocócicas, estafilocócicas y todas aquellas que respondan a la penicilina en disolución salina fisiológica. Normalmente estas preparaciones no causan trastorno alguno a los pacientes, excepto un ligero dolor debido a la presión. Una

²¹⁰ Es preferible emplear la cantidad máxima señalada, aunque se pueden utilizar, con buenos resultados, cantidades de 250-300 mg. Se sabe que la cantidad máxima de 300 U.O. de calcio-penicilina ocupa un volumen de aproximadamente 0,2 cm³ y, por consiguiente, se mezcla con 0,8 cm³ del vehículo aceite de cacahuete y cera. Si la cantidad de calcio-penicilina se aumenta sobre la cantidad máxima de 300 mgr/cm³, el efecto conseguido es solo incrementar el nivel sanguíneo de penicilina durante un breve período de tiempo y no el de prolongar la acción de la penicilina.

²¹¹ En la memoria se refieren más casos similares; señalamos sólo uno más de ellos: una mezcla de calcio-penicilina, cera y aceite de cacahuete preparada en la proporción de calcio-penicilina de 600-800 U.O./mg. y 4,0% de peso de cera, origina un preparado que contiene 200.000 U.O./cm³; una inyección intramuscular de un centímetro cúbico de esta preparación muestra, al cabo de 6 horas, un máximo de penicilina en sangre de 1,25 U.O./cm³. El nivel sanguíneo de penicilina al cabo de 16 horas de inyectar el preparado fue de 0,39 U.O./cm³. En la orina, se detectó la presencia de penicilina durante las 60 horas posteriores a la inyección.

²¹² Una libra equivale a 453,59 g.

inyección única diaria produce un efecto sólo logrado, hasta el momento de redactarse esta memoria, por al menos ocho inyecciones diarias de penicilina en disolución salina. Según señalan los autores, sus estudios clínicos han demostrado que este preparado no tiene gran efecto secundario sobre el pulso y los estudios hematológicos revelaron que no hay grandes consecuencias perjudiciales, en especial sobre el tiempo de sangría, de coagulación y de protrombina. Análogamente, estudios microscópicos y macroscópicos de los tejidos en el lugar de la inyección presentan resultados que no difieren de los encontrados en el sitio de la inyección de cualquier medicamento en aceite.

Las mezclas de penicilina, cera y aceite de cacahuete se deben calentar ligeramente antes de emplearse para facilitar la toma del líquido mediante una aguja de calibre nº 18 y su inyección con una aguja de calibre nº 20. La mezcla se calienta a 50°-60° C, durante un tiempo de tres a cinco minutos; la mezcla se agitará para asegurar su caldeo uniforme. El equipo ha de estar completamente seco.

La estabilidad de las preparaciones estudiadas es elevada y puede mantenerse a 37° C por un tiempo de nueve o más meses sin pérdida de su potencia. Tampoco hay deterioro de la mezcla de calcio-penicilina, cera y aceite de cacahuete durante 24 a 36 horas a 56° C, o durante dos horas a 100° C. Las mezclas, por lo tanto, pueden almacenarse en una nevera o cámara frigorífica a la temperatura local o una temperatura de 37° C sin perjuicio alguno.

Vistos los resultados anteriores parece concluirse que la acción de la penicilina puede prolongarse grandemente por inyección intramuscular de mezclas de calcio-penicilina, cera y aceite de cacahuete. Esta mezcla puede ser administrada a los pacientes por la boca, para producir niveles terapéuticos eficaces en sangre, con resultado clínico satisfactorio.

El 2 de marzo de 1948, esta misma empresa norteamericana, *The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.*, solicitó un certificado de adición por “Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal número 182.483”²¹³. De manera complementaria a lo mantenido en la patente principal, los autores proponen la mezcla de penicilina cristalina, por ejemplo sodio-penicilina o potasio-penicilina, o bien de penicilina amorfa, por ejemplo calcio-penicilina, con un vehículo anhidro caliente de cera en aceite de cacahuete²¹⁴; sorprende que, en la patente principal se apueste sólo por las combinaciones con calcio-penicilina.

El procedimiento se presenta de forma práctica: calienta un aceite de cacahuete esterilizado y altamente refinado a una temperatura de 40°-45° C; por otro lado calienta cera blanqueada y esterilizada a una temperatura de 50°-55° C, hasta que forma un líquido claro. A continuación mezcla la cera en estado líquido con el aceite de cacahuete caliente, luego el derivado de penicilina y el vehículo de aceite y cera se mezclan hasta obtener una suspensión completamente homogénea. La mezcla íntima en fusión de los

²¹³ AHOEPM, patente 182.707; la memoria descriptiva, de veinticinco hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, queda fechada en Madrid, a 2 de marzo de 1948; como domicilio de la empresa consta el 111, East Redwood Street, Baltimore (Maryland. EE.UU.). La patente española fue concedida el 3-III-1948 y hecha pública el 16-IV-1948.

²¹⁴ Como complemento de la patente principal, se señala en este certificado de adición la posibilidad de utilizar, junto al aceite de cacahuete, otros aceites, por ejemplo aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de avena, aceite de semilla de algodón y también aceites animales, para producir esta misma acción prolongada de la penicilina.

componentes puede favorecerse agitando en un depósito caliente o por medio de un mezclador mecánico.

Pese a que este certificado de adición parece destinado a ampliar los compuestos de penicilina empleados en este tipo de preparados; los autores realizan sus valoraciones utilizando una mezcla de calcio-penicilina, cera y aceite de cacahuete, dotada de una potencia de 300-4.000 U.O./mgr, empleando un vehículo de 3,2 % en peso de cera, al igual que lo hicieron en la patente principal. No obstante, mantienen que efectos semejante se pueden lograr usando sales cristalinas de penicilina, por ejemplo sodio-penicilina y potasio-penicilina.

La viscosidad de las mezclas resultantes conteniendo sodio-penicilina cristalina o potasio-penicilina cristalina, a la temperatura ambiente, puede compararse con las de las mezclas conteniendo calcio-penicilina amorfa. La viscosidad preferida de la penicilina en mezcla de cera y aceite de cacahuete debe ser tal que la mezcla no fluya a la temperatura del local (25° C), ya que las preparaciones viscosas son las que producen en la sangre niveles de penicilina que perduran 24 horas.

En la memoria se exponen los ensayos clínicos realizados en 150 pacientes que recibieron sodio-penicilina y un número igual de pacientes que recibieron potasio-penicilina en mezcla con cera y aceite de cacahuete. Los análisis de sangre fueron realizados a intervalos de 30 minutos, 4 horas y 24 horas. Los resultados de estos estudios demostraron que el 90% de los 300 pacientes tratados tuvo en la sangre un nivel de penicilina de 0,039 U.O./cm³, o más elevado, a las 24 horas después de la inyección; mientras que con la mezcla de calcio-penicilina amorfa, cera y aceite de cacahuete sólo el 70%-75% de los pacientes presentaron estos niveles por igual período de tiempo.

En ciertos casos se observó que cuando un paciente recibía una inyección de la preparación a las 9:00, tras 18 a 20 horas después de la inyección (3:00-5:00), aparecía un descenso en el nivel de la sangre y subsiguientemente una elevación a las 24 horas. Esto ocurre no solo cuando el paciente está en cama, sino cuando existe una menor actividad muscular; entonces se produce una menor absorción de penicilina en el tiempo. Por tanto, existe una situación en la que simultáneamente no solo es más pequeña la cantidad de penicilina aprovechable, sino que también se presenta una absorción reducida. Estas observaciones indican que es conveniente que la inyecciones se realicen en la última parte del día, hacia las 16:00 horas o después, para obtener los niveles óptimos de penicilina²¹⁵.

2.2.3.c. Procesos de purificación cromatográficos

La purificación de la penicilina, o de sus sales metálicas, es muy importante en su proceso de fabricación; la separación de las sustancias activas de las impurezas que las acompañan es una operación difícil y molesta. Los preparados de penicilina impuros obtenidos de los hongos que la producen suelen contener hasta un 90% de productos secundarios inactivos, casi siempre de naturaleza ácida y algunos de ellos intensamente coloreados. La separación de la mayoría de las impurezas es muy importante para obtener preparados terapéuticos aceptables; y a ello se dirigieron los trabajos de Edward

²¹⁵ Esto es cierto al tratarse de pacientes ambulatorios, ya que la cantidad máxima de actividad muscular se presenta durante el día; para pacientes en cama es preferible utilizar el mismo tiempo (16:00 horas), aunque no existe aquí tan gran diferencia en los niveles producidos en sangre.

Abraham y Ernst Boris Chain publicados en junio de 1942²¹⁶ y de J.R. Catch, A.H. Cook y I.M. Hetxbron, aparecidos en noviembre de este mismo año²¹⁷.

El 30 de enero de 1946 la empresa norteamericana *Hoffmann-La Roche Inc.*, presentó ante el registro español de patentes un expediente para proteger “Un procedimiento para preparar penicilina purificada”²¹⁸; en él se trata de desarrollar un método mediante el cual las soluciones impurificadas de penicilina sean purificadas, en tal magnitud, que se obtengan preparados incoloros o ligeramente coloreados, menos irritantes, menos tóxicos y más estables que aquellos que en aquel momento se fabricaban.

Proponen que podría conseguirse una purificación mayor de un preparado impuro cromatografiándolo por uno de estos dos procesos:

- Haciendo pasar una solución de la penicilina libre impura en un disolvente orgánico, por una columna de un silicato de magnesio y extrayendo la penicilina del absorbente.
- Haciendo pasar una solución acuosa de una sal de metal alcalinotérreo de la penicilina impura por una columna de óxido de aluminio y aislando la penicilina del producto colado.

Los autores señalan que, realizando por separado los dos procedimientos que se acaban de mencionar, se obtienen productos purificados que son satisfactoriamente puros para fines terapéuticos y presentan una actividad de hasta 1.000 U.O./mg., e incluso más altas; si se combinan los dos procedimientos, sin tener en cuenta el orden de operaciones en el método combinado, se obtiene un producto con grado de pureza mucho mayor. Los preparados penicilínicos resultantes sólo tienen un color ligero, presentan una actividad de alrededor 1.400 U.O./mg. y pueden transformarse, con buen rendimiento, en la sal sódica de penicilina, incolora y cristalina.

La purificación cromatográfica de los preparados de penicilina en forma de soluciones acuosas de sus sales de metales alcalinotérreos en columnas de óxido de aluminio es un procedimiento novedoso pues Edward Abraham y Ernst Boris Chain sólo realizaron cromatografía de disoluciones impurificadas de penicilina libre disueltas en éter sobre óxido de aluminio; es éste un procedimiento sencillo y eficaz para la

²¹⁶ Edward ABRAHAM, Ernst Boris CHAIN, E.R. HOLIDAY. “Purification and some physical and chemical properties of penicillin: with a note on the spectrographic examination of penicillin preparations”. *The British Journal of Experimental Pathology*, 23(3): 103-119. Londres, 1942. Para purificar un preparado de penicilina libre disuelto en éter describen el uso de óxido de aluminio como absorbente en una columna cromatográfica, aunque comprobaron que este método no permite una separación adecuada de los productos secundarios intensamente coloreados.

²¹⁷ J.R. CATCH, A.H. COOK, I.M. HETXBRON. “Purification and Chemistry of Penicillin”. *Nature*, 150(3813): 633-634. Londres, 1942. Al comprobar que sus tentativas de purificar el material por el procedimiento de Abraham y Chain no daba buen resultado, desarrollaron un nuevo procedimiento consistente en hacer pasar una solución de penicilina impura libre en un disolvente orgánico, como podía ser éter o acetato amílico, por una columna de gel de sílice hidratado que tiene una base inorgánica. Aunque este método supuso un avance sobre el anterior, era igualmente insatisfactorio en cuanto a la separación de impurezas coloreadas.

²¹⁸ AHOEPM, patente 172.377. La memoria consta de 18 hojas escrita a máquina, por una sola cara; queda firmada, en Madrid, a 30 de enero de 1946. La empresa se encuentra establecida en Roche Park, Nutley (New Jersey. EE. UU.). Este mismo expediente, según en él se señala, fue presentado ante el registro de la propiedad de los Estados Unidos de América, el 27-VI-1944, asignándosele el registro 542.440/44. La patente española fue concedida con fecha de 13-IX-1946 y publicada el 16-X-1946.

separación de la mayoría de los productos secundarios que sean incoloros, pero las sales de los metales alcalinos de preparados de penicilina impurificados no dan resultados de purificación satisfactorios cuando se hacen pasar en solución acuosa por columnas de óxido de aluminio.

Los autores señalan que los silicatos de magnesio son mejores absorbentes para la purificación cromatográfica de preparados de penicilina libre que otros productos; al usarlos se obtienen rendimientos más altos de penicilina purificada, pues prácticamente la actividad de la penicilina permanece constante en este proceso de purificación. El material activo queda libre del absorbente por un lavado con agua o con un neutralizador acuoso adecuado.

Los preparados de la sal sódica de penicilina, con gran pureza, que se han obtenido por medio del uso de estos dos procesos pueden ser tratados con disolventes orgánicos anhidros, por ejemplo de naturaleza cetónica o alcohólica, para propiciar su cristalización. Se pueden obtener así preparados de la sal sódica de penicilina completamente incoloros y cristalinos en forma anhidra, por recrystalización en una mezcla de dichos disolventes orgánicos²¹⁹. La memoria se complementa con una serie de ejemplos²²⁰.

2.2.3.d. Procesos de purificación mediante bases orgánicas

Durante la segunda mitad de la década de 1940, el procedimiento habitualmente empleado para la recuperación de sales de penicilina de las capas inferiores del recipiente productor consistía en la acidificación del fluido acuoso de las capas inferiores (el 'caldo'), mediante la adición de un ácido, con lo cual se acidifica el 'caldo'. El 'caldo' ácido se extrae mediante un solvente adecuado, solo parcialmente

²¹⁹ En un preparado de penicilina impuro, obtenido de un cultivo sumergido de *Penicillium notatum* 832 (Laboratorio Regional Septentrional de Investigaciones del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos), que se purifica cromatográficamente usando los dos métodos dichos, y recrystalizando su sal sódica altamente purificada por medio de mezclas de metanol e isopropanol, se obtuvo una sal sódica de penicilina cristalina, incolora y anhidra, que poseía una rotación óptica constante de $[\alpha]_D^{25} + 300$ en una solución acuosa al 1% a pH 6. Si la muestra de la sal sódica de penicilina anhidra se obtiene de cultivos superficiales de *Penicillium notatum*, género n° 1249-B21 (proporcionados por el Laboratorio Regional Septentrional de Investigaciones del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos), operando de la misma forma, el resultado obtenido es idéntico. La actividad de ambos preparados era de 1.600-1700 U.O/mg.

²²⁰ Hasta un total de siete ejemplos; señalamos el primero de ellos: en 150 cm³ de agua se disolvieron 6 g. de sal magnésica impurificada que poseía una actividad de 350 U.O/mgr; la solución es intensamente coloreada. Se vertió en una columna (3 cm. x 32 cm.) de 200 g. de óxido de aluminio lavado con agua. Se opera cromatográficamente. El producto colado se recogió cuando mostró un vestigio de coloración amarilla; se tomaron tres fracciones de 260 cm³, 240 cm³ y 236 cm³ respectivamente; estas fracciones se enfrían a 0° C, se acidifican con ácido fosfórico al 10% hasta obtener un pH 3. Cada una de ellas se extrae con 300 cm³ de acetato butílico (también pueden usarse otros acetatos, cloroformo, éter y disolventes adecuados para lograr la extracción de la penicilina). Las tres soluciones de acetato butílico se secan con sulfato sódico y son extraídas usando pequeñas cantidades de una solución acuosa de hidróxido sódico 0.1 N, hasta llegar a un pH de 6.5. A continuación son congeladas y secadas al vacío. Se obtuvieron así tres fracciones de una sal sódica de penicilina de color amarillo claro; las dos primeras contenían prácticamente toda la actividad. Para extraer la penicilina purificada de su solución en un disolvente orgánico se puede también emplear carbonato o bicarbonato sódico. Si se usan soluciones o suspensiones acuosas de hidróxido amónico, hidróxido lítico, hidróxido de bario, carbonato cálcico, carbonato de estroncio, carbonato magnésico, óxido magnésico u otros hidróxidos, óxidos, carbonatos o bicarbonatos alcalinos o alcalinotérreos, se obtienen las correspondientes sales de penicilina de los metales alcalinos o alcalinotérreos, después que se hayan congelado y secado las respectivas soluciones.

soluble en agua, como podía ser el acetato de amilo o el acetato de butilo. Así se obtiene un extracto en el cual, además de contener una mezcla de los ácidos libre de penicilina, aparecen otras sustancias que reaccionaron con ácidos, sustancias coloreadas y otras impurezas. Esta primera materia prima es purificada añadiendo la penicilina a una solución acuosa tampón, generalmente una solución tampón de fosfato de sodio; en esta solución tampón se disuelven los ácidos de penicilina y también sus sales sódicas. Si es preciso esta operación se puede repetir durante el paso de una fase a otra y viceversa. La penicilina es liberada de las impurezas que no reaccionan con ácidos.

Para separar la penicilina también de las impurezas que reaccionan con los ácidos, en especial las materias coloreadas, es necesario adicionar al proceso de purificación hasta aquí descrito otras operaciones que, aunque frecuentemente se empleen con otros fines, permiten obtener una purificación adicional. Por lo tanto, estas operaciones constituyen un segundo paso en el proceso total de la purificación.

Entre los procesos de purificación propios de esta segunda fase se encuentra la reacción entre una sal de penicilina de amina y una sal potásica de un ácido orgánico, efectuada dentro de un disolvente orgánico adecuado; esto es, un solvente orgánico en el cual el penicilinato potásico es muy poco soluble pero, en cambio, la sal de amina con el ácido orgánico es fácilmente soluble, por ejemplo, etanol anhidro.

El 11 de enero de 1947 es la empresa británica *Glaxo Laboratories Limited* quien presenta, ante el registro de patentes español, un expediente para proteger, por veinte años, su invención de “Un procedimiento para preparar sales de penicilina en gran estado de pureza”²²¹, basado en la conversión de la penicilina en una sal o sales de una o más bases orgánicas primarias.

Una solución de penicilina impurificada, en un disolvente adecuado²²², se trata con una o más bases orgánicas primarias²²³, de modo que formen una o más sales sólidas de base orgánica primaria y de penicilina, que son separadas de la solución

²²¹ AHOEPM, patente 176.397; la memoria descriptiva consta de diez y seis hojas mecanografiadas por una sola cara, queda firmada en Madrid, a 11-I-1947. Como domicilio de la empresa figura Greenford, Middlesex (Inglaterra). Esta solicitud se corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 28-I-1946, bajo el número de registro 2.740/46. La patente española, de invención, fue concedida el 13-I-1947 y publicada el 1-III-1947.

²²² En la memoria se especifica que la expresión ‘disolvente secundario adecuado’ ha de entenderse como referencia a un disolvente en el cual las sales orgánicas primaria y de penicilina son relativamente insolubles, pero las sales de las impurezas que normalmente están en la penicilina impurificada son solubles en él. Un disolvente que cumple estas condiciones es el éter dietílico, aunque pueden emplearse otros disolventes como acetato amílico o metil-isobutil-cetona. En general, los hidrocarburos halogenados no son satisfactorios, pero es posible usar cloroformo, con una técnica modificada: ocurre que si se emplea cloroformo para extraer la penicilina de una solución acuosa acidificada a la cual se le adiciona una base orgánica adecuada, la sal de penicilina que se forma generalmente permanece en la solución; se cristaliza añadiendo un volumen adecuado de un disolvente orgánico, como puede ser acetona o metil-etil-cetona; preferentemente se añade una pequeña porción de tal disolvente secundario y varios volúmenes de un disolvente relativamente inerte, tal como el tetracloruro de carbono o éter.

²²³ Aclaran los autores que, cuando se refieren a una ‘base orgánica primaria’, hacen referencia a una composición de fórmula general $R-NH_2$, donde R es un radical de hidrocarburo que, si es un grupo alcohilo o alquenílico, contiene como máximo 4 átomos de carbono, pero en otros casos puede llegar a contener hasta 8 átomos de carbono, teniendo un pK no inferior a 10.2; cita como ejemplos de estas bases: ciclohexil-amina, metil-ciclohexil-amina, mono-etil-amina, isopropil-amina y n-butil-amina.

remanente; antes de añadir la base orgánica primaria, es conveniente adicionar una cierta cantidad de disolvente secundario²²⁴. Es factible, según señalan los autores, que las sales de base orgánica primaria y penicilina puedan convertirse fácilmente en sales metálicas de un elevado grado de pureza. Es muy recomendable purificar las sales de base orgánica primaria por lavado, por nueva cristalización o de los dos modos, antes de transformarlas en sales metálicas.

Como material de partida ha de emplearse una sal metálica impurificada, preferentemente una sal sódica o cálcica de penicilina y, a ser posible, que contenga al menos un 20% de la sal en cuestión, o bien una solución acuosa de esta sal que contenga, aunque no necesariamente, hasta un 7% de penicilina efectiva; se puede usar una solución de sal metálica de penicilina tal y como se obtiene por el método normal de extracción de la penicilina desde la solución nutritiva. Si esta solución se acidifica con agitación, a un pH de *ca.* 2,5, por la adición de ácido fosfórico o de otro ácido enérgico, se origina penicilina que puede ser extraída, junto con algunas impurezas, mediante un disolvente orgánico; es preferible emplear metil-isobutil-cetona o éter dietílico; para hacer más eficaz la extracción, es conveniente disponer en la solución acuosa una sustancia tal como cloruro sódico. A continuación se añade, preferentemente agitando, una cantidad adecuada de un disolvente secundario; los autores recomiendan emplear de 5%-30% en volumen de acetona o metil-etil-cetona como disolvente secundario, en aquellos casos en los cuales se use como disolvente principal éter dietílico; luego se ha de añadir, preferentemente con agitación, la base orgánica primaria seleccionada; la cantidad de base añadida será, al menos, igual a un equivalente molar de la penicilina presente²²⁵. Al producirse la reacción correspondiente, precipita un sólido macro- o microcristalino que puede estar o no mezclado con impurezas de naturaleza gomosa; es una sal de base orgánica primaria y de penicilina. Esta sustancia, producida con buen rendimiento, es separada por filtración y puede ser purificada por lavado, por nueva cristalización o de ambas formas²²⁶.

Las sales de bases primarias y de penicilina pueden purificarse más por nueva cristalización; para ello se disuelven en un volumen mínimo de alcohol y, a continuación, se añaden tres volúmenes de éter dibutílico; el conjunto se deja enfriar lentamente a 1°-0° C y se filtra; también pueden usarse otros alcoholes y éteres superiores. La sal de base orgánica, así como la de penicilina purificada, pueden ser transformadas, por diversos métodos, en sales metálicas de penicilina, normalmente de sodio o de calcio, que en todos los casos son mucho más puras que los materiales de

²²⁴ En ausencia del disolvente secundario, las sales de dichas impurezas precipitarían con las sales de penicilina. Los autores recomiendan emplear metil-isobutil-cetona como disolvente principal y añadir de 2% a 10% de alcohol etílico como disolvente secundario. Por supuesto, hay muchas combinaciones posibles de disolvente principal y secundario, teniendo en cuenta tanto la naturaleza como las cantidades relativas del disolvente empleadas.

²²⁵ Los autores señalan que puede ocurrir que el equivalente molar exacto no sea el óptimo, pero la cantidad de base orgánica primaria que, en cada caso particular, se debe añadir, “es fácilmente determinable en el laboratorio operando sobre muestras de ensayo de la sal metálica impurificada que se va a utilizar”, sin aclarar esta afirmación. Mantienen que, en la práctica, se comprueba que es adecuada la adición de la base primaria hasta que no se forme más precipitado, pero generalmente es aconsejable que la cantidad empleada de base orgánica primaria no exceda de una cantidad equivalente a la acidez total de la solución de penicilina impurificada que se está tratando.

²²⁶ Si no se añade disolvente secundario y si la sal de base orgánica primaria y de penicilina se precipita desde una solución de penicilina impurificada en un disolvente principal, el precipitado podrá ser una sustancia sólida, un aceite o una mezcla de ambos, dependiendo del grado de pureza inicial de la penicilina, de la combinación de los reactivos empleados y de la naturaleza del disolvente.

partida; un método adecuado para lograr esta transformación es el siguiente: la sal de la base orgánica primaria es añadida, agitando rápidamente, a una mezcla de éter o cloroformo y ácido fosfórico acuoso que contenga una cantidad de ácido fosfórico al menos equivalente a la cantidad de base orgánica contenida en la sal a tratar; se separa el extracto orgánico; la solución acuosa se ajusta a un pH de 2,5; se realizan extracciones con disolvente orgánico; se mezclan los extractos y la mezcla se somete a extracción con una solución acuosa de un hidróxido metálico, como podía ser el hidróxido sódico, que ha de contener una cantidad de hidróxido metálico equivalente a la cantidad de penicilina en la fase orgánica; el extracto acuoso es secado por congelación. Para facilitar la compresión de este procedimiento, así como la forma de llevarlo a cabo, los autores proponen una serie de ejemplos²²⁷.

El 10 de febrero de 1947, esta misma empresa británica, *Glaxo Laboratories Limited*, presenta ante el registro español una solicitud para proteger, por veinte años, su invención relativa a “Un procedimiento de purificar sales de penicilina”²²⁸. Esta patente es, en realidad, una ampliación de su homóloga, la patente 176.397 (*vide supra*), ambas solitadas por la misma compañía industrial, aunque con cinco meses de diferencia.

Los estudios de *Glaxo Laboratories Limited* pusieron de manifiesto que cuando una solución acuosa de una sal metálica impurificada de penicilina (por ejemplo, sódica o cálcica) se trata con una sal adecuada de una base orgánica primaria²²⁹, se produce una

²²⁷ Incluyen los autores en la memoria un total de cuatro ejemplos; éste es el primero: se disuelven en una solución acuosa de 250 ml. de cloruro sódico al 25%, 5,3 u.m [unidades mega, es decir 1.000.000 de U.O.] de sal sódica de penicilina. La solución debe ser ajustada a un pH de 2,5 con ácido fosfórico; se somete a extracción dos veces con éter, cuyo extracto se seca por enfriamiento en anhídrido carbónico y acetona y posterior filtrado. La solución etérea seca se agita con 1,5 g. de carbón vegetal decolorante, se filtra y el sólido se lava profundamente con éter. Se mezclan el filtrado y las lavaduras, obteniéndose un volumen aproximado de 900 ml. Se añade acetona (45 ml.) y una solución etérea al 10% v/v de ciclohexil-amina (10 ml.). Se deja reposar unos minutos a la temperatura ambiente. La mezcla se filtró y el sólido se lavó cuatro veces con acetona seca agitándolo, posteriormente se filtró. El sólido resultante es de color amarillo crema, después de secarlo pesó 2,82 g. Este sólido se disolvió en 60 ml. de cloroformo caliente al que se le añaden 180 ml. de acetona. Se obtiene como resultado una sal de ciclohexil-amina y penicilina que cristaliza lentamente, la mezcla se enfrió a unos -20° C y, a continuación, se filtró. Las aguas madre se concentran a 10 ml. y se le añaden 30 ml. de acetona, con lo que se consigue precipitar una segunda recogida. El rendimiento que se obtiene, un sólido blanco, fue de 2,12 g. (primera recogida), más 0,30 g. (segunda recogida) dando en el ensayo pertinente 166 U.O./mg. De ellos, 2,2 g. de sal de ciclohexil-amina y penicilina purificada son agitados en 50 ml. de agua helada en presencia de 100 ml. de cloroformo; se añaden 6 ml. de ácido fosfórico al 10% y se consigue que la mezcla se ajuste a un pH de 2,1. El extracto en cloroformo se agitó con 235 ml. de agua y 4,6 ml. de solución de hidróxido sódico 1 N, con lo que se obtiene un pH de 5,9. Después de la separación, el cloroformo se agitó con 15 ml. de agua y 0,2 ml. de solución de hidróxido sódico 1 N, resultando un nuevo pH de 7,4. Las soluciones acuosas, que poseían un gran volumen, se secaron por congelación y el sólido que se obtuvo se disolvió en 40 ml. de acetona, cristalizando rápidamente la sal pura sódica de penicilina. La cantidad obtenida fue de 1,57 mg., tenía una potencia de 1.640 U.O./mg.

²²⁸ AHOEPM, patente 176.753; la memoria descriptiva consta de catorce hojas mecanografiadas por una sola cara, queda firmada en Madrid, a 10-II-1947. Esta solicitud se corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 11-II-1946, con registro 4.202/46. La empresa figura como establecida en Grenford, (Middlesex, Inglaterra). La patente española, de invención, fue concedida el 11-II-1947 y hecha pública el 16-III-1947.

²²⁹ La expresiones de ‘base orgánica primaria adecuada’ cobra aquí el mismo sentido que en otras patentes anteriores de la empresa (*vide supra*); ‘una sal adecuada de una base orgánica primaria’ hace referencia al producto formado por combinación entre una ‘base orgánica primaria adecuada’ y un ácido fuerte o moderadamente fuerte, tal que ni el ácido ni la sal, en la condiciones del proceso, destruyan

doble descomposición: la correspondiente sal de penicilina y la base orgánica primaria. Estas sales pueden aislarse como tales y, si conviene, purificarse y transformarse en sales metálicas de penicilina (preferentemente de sodio o de calcio), que poseen una pureza mayor que la de la sal metálica de penicilina original.

Como material inicial, los autores emplean una solución acuosa enfriada de sal metálica impurificada (por ejemplo de sodio o de calcio) de penicilina, que suele tener una actividad de 400 U.O./mg. o superior; su concentración en la solución acuosa de partida es de 2%-10% (peso/volumen). Conviene que esta solución tenga una sustancia ‘saladora’ (una sal que posea alta solubilidad en agua)²³⁰. La solución ha de ser preferiblemente neutra, aunque no de manera necesaria.

Esta solución se enfría y, al mismo tiempo, se le añade, agitando enérgicamente, una cantidad de una sal adecuada de una base orgánica primaria, que puede ser en forma de sustancia prácticamente pura o como solución acuosa concentrada. La cantidad de esta sal de base orgánica ha de ser, al menos, equivalente a la cantidad de penicilina presente. Toda la mezcla ha ajustarse a un pH 6-7, adicionando lentamente y agitando un ácido, como por ejemplo ácido fosfórico, o una base inorgánica, como la sosa cáustica. La mezcla obtenida se agita y se enfría hasta conseguir que cese la precipitación. El producto obtenido es la sal impurificada de penicilina y de la base orgánica primaria que se ha empleado; se separa por filtración o centrifugación; se lava con una pequeña cantidad de una solución acuosa casi saturada de una sustancia ‘saladora’; se origina una solución acuosa neutra y el producto se libera todo lo posible de agua por filtración o centrifugación continuadas.

El producto, aún húmedo, se trata de diversas formas: gran cantidad del agua se puede eliminar dejándolo reposar durante varias horas sobre un agente secador, como es el pentóxido de fósforo, en un desecador en el que se ha hecho el vacío; cuando está seco, puede lavarse con acetona o metil-cetona. El producto seco se calienta suavemente y se le adiciona cloroformo, un poco más del suficiente para disolver el material orgánico; se opera a una temperatura de 30° C. La mezcla caliente se filtra rápidamente para separar el material inorgánico no disuelto. Al filtrado se le añade acetona o metil-cetona, se enfría y precipita la sal purificada de penicilina y base orgánica primaria.

También es posible volver a cristalizar el material húmedo sin secarlo. En este supuesto, el material es disuelto directamente en cloroformo y la solución puede ser filtrada de la pequeña capa acuosa que existe al diluir, con dos o tres volúmenes de acetona o metil-cetona, la sal purificada de base primaria se separa por cristalización. Existe aún otro procedimiento alternativo que consiste en disolver el material húmedo en un pequeño volumen de alcohol etílico (ca. 3-5 ml.), por cada unidad mega [1.000.000 de U.O.] de penicilina usada al comienzo del proceso.

Es necesario filtrar los vestigios que pueda haber del agente salador empleado. La sal purificada de penicilina y de base orgánica precipita al añadir a la solución alcohólica de una a tres veces su volumen de éter dietílico, diisopropílico o dibutílico.

la penicilina o sus sales; los autores recomiendan el empleo de sales de bases orgánicas primarias de ácidos minerales fuertes, como puede ser el clorhídrico.

²³⁰ Las sustancias preferidas para realizar esta acción ‘saladora’ son cloruro sódico, sulfato sódico, cloruro potásico y similares; las sales amónicas no son adecuadas y, por supuesto, no deben ser empleadas sales que tengan una acción destructiva sobre la penicilina. La cantidad que ha de usarse de sustancia ‘saladora’ debe ser tal que prácticamente sature la solución; si se usa una sal cálcica es necesario emplear primeramente la sal básica y luego el producto ‘salador’ pues si no se operase así es probable que la sustancia ‘saladora’ origine un precipitado que contiene penicilina.

Conseguido ya el producto purificado, éste puede ser transformado por diversos métodos en sales metálicas puras (por ejemplo de sodio o de calcio) de penicilina, si se le añade, agitando fuertemente, una mezcla de éter o cloroformo y ácido fosfórico, tal que la cantidad de ácido fosfórico sea, al menos, equivalente a la cantidad de base orgánica contenida en la sal a tratar. Se separa a continuación el extracto orgánico, se fija la solución acuosa a un pH de 2.5, se extrae con más disolvente orgánico, se mezclan los extractos, se procede a la extracción de esta mezcla con una solución acuosa de un hidróxido metálico (por ejemplo, hidróxido sódico) que contenga una cantidad de hidróxido metálico, equivalente a la cantidad de penicilina (ácido libre) y se deseca por congelación del extracto acuoso.

Los autores acompañan su memoria de una serie de ejemplos sobre cómo puede prepararse una sal de penicilina y de base orgánica primaria esencialmente pura²³¹.

El 16 de abril de 1948, de nuevo los laboratorios *Glaxo Laboratories Limited* acudieron al registro español de patentes para presentar un expediente con el que proteger, por veinte años, su invención sobre “Un procedimiento para la preparación de sales de penicilina”²³². Es ésta continuación de otras dos patentes españolas (patentes 176.397 y 176.753); en ellas se describieron procedimientos para la preparación de sales de penicilina en estado prácticamente puro, en los cuales la penicilina impurificada, o sus sales metálicas, son convertidas en sales de bases orgánicas primarias. Las sales alcalinas de penicilina, y en especial la sal sódica, son muy solubles, en consecuencia es dificultoso preparar estas sales en un grado de pureza adecuado. El método propuesto en esta patente diseña un procedimiento mediante el cual puedan prepararse sales alcalinas de penicilina en estado virtualmente puro, mediante una técnica simplificada²³³.

²³¹ Incluyen los autores un par de ejemplos; éste es el primero: en 32 ml. de agua saturada a 0° C con nitrato sódico se disolvieron 2,5 u.m. [unidades mega, 1.000.000 de U.O.] de sal sódica de penicilina que tiene una potencia de 910 U.O./mg. A esta solución se añadió hidrocloreto de ciclo-hexil-amina en solución acuosa al 50%, en una cantidad equivalente al doble del de la penicilina presente. La nueva solución se fijó a pH 6; se dejó en reposo durante 30 minutos, antes de ser filtrada. El sólido obtenido se lavó con unos pocos ml. de solución saturada de nitrato sódico. El sólido húmedo se calentó ligeramente con 25 ml. de cloroformo y la solución se filtró mediante un filtro seco, para separar unas pequeñas gotas de la solución acuosa. Obtenido el filtrado, a éste se le añaden 75 ml. de acetona. Se deja reposar aproximadamente una hora en el refrigerador y, a continuación, la mezcla es filtrada. Se recupera de esta forma una segunda recogida y el filtrado se concentra a presión reducida y se deja cristalizar. Las cantidades de sal pura de penicilina y ciclo-hexil-amina fueron 1,53 g. en la primera recogida y 0,1 g. en la segunda. La sal obtenida se convirtió en sal sódica de penicilina agitándola en agua con hielo (1 parte) y cloroformo (2 partes), adicionando la cantidad suficiente de ácido fosfórico al 10% y agitando para ajustar la solución a un pH de 2.1. El extracto clorofórmico se agitó con agua y una solución de hidróxido sódico 1 N para ajustarlo a un pH de 5,9. Después de la separación, el cloroformo se agitó con una pequeña cantidad de agua y solución de hidróxido sódico 1 N para ajustarla a un pH de 7.4. Las soluciones acuosas se extendieron y fueron secadas por congelación; el sólido resultante fue nuevamente cristalizado con acetona, momento en el cual cristalizó rápidamente la sal sódica de penicilina pura.

²³² AHOEPM, patente 183.316; la memoria descriptiva consta de diecinueve hojas, mecanografiadas, escritas por una sola cara; queda firmada en Madrid, el 16 de abril de 1948. Este expediente se corresponde al presentado en la Gran Bretaña el 17-IV-1947, recogido bajo el registro número 10.234/47 con descripción provisional y completada el 17-III-1948. Como domicilio de la empresa figura Grenford (Middlesex, Inglaterra). La patente española, en su modalidad de invención, fue concedida el 6-XI-1948 y publicada el 1-XII-1948.

²³³ Los autores de la memoria señalan que emplean el vocablo ‘alcalino’ para productos que incluyen el grupo NH_4^- .

Los autores parten de la comprobación previa de que si una sal de penicilina y una base orgánica²³⁴ se ponen en contacto con una sal alcalina de un ácido adecuado²³⁵, ocurre una reacción mediante la cual se forma una sal alcalina de penicilina cristalizada en el medio líquido del cual la susodicha sal se puede extraer, mientras que el otro u otros productos de la reacción permanecen disueltos en este medio. La sal alcalina de penicilina cristalizada, resultante de este procedimiento, puede ser extraída de los productos de reacción y seguir siendo purificada por nueva cristalización.

Como medio líquido adecuado se puede utilizar cualquier disolvente, o mezcla de disolventes, en los cuales la sal de base orgánica de penicilina y la sal alcalina del ácido tengan una cierta solubilidad, pero en los que la sal alcalina de penicilina sea virtualmente insoluble; por supuesto, el medio líquido debe estar exento de impurezas que destruyan la penicilina. Los autores mantienen que es preferible usar un alcohol monovalente o mezclas de alcoholes monovalentes como medio líquido²³⁶; lo más adecuado es preparar una suspensión de la sal de base orgánica en el medio líquido y una suspensión (o 'gel') de la sal alcalina en el mismo medio, y añadir cualquiera de estos preparados al otro; luego, si es necesario, agitar y/o calentar la mezcla de forma que ocurra la reacción deseada²³⁷. En la memoria se proponen unos ejemplos ilustrativos para facilitar el modo en que este procedimiento puede ser llevado a la práctica²³⁸.

²³⁴ Con la expresión 'base orgánica adecuada' los autores hacen referencia a cualquier base orgánica primaria, secundaria o terciaria que no destruya la penicilina, originando con ella sales cristalizadas. En la memoria se señala que es preferible emplear cualquiera de las sustancias que a continuación se citan: ciclo-hexamina, metil-ciclo-hexil-amina, mono-etil-amina, tri-metil-amina, iso-propil-amina, N-butil-amina, N-etil-piperidina, fenil-etil-amina, N-etil-hexa-hidropicolina y N-etil-pirrolidina.

²³⁵ Este concepto de 'ácido adecuado' hace referencia a cualquier ácido alifático que no destruya rápidamente la penicilina en las condiciones de reacción y que no tenga más de ocho átomos de carbono en la cadena alifática rectilínea, excluyendo el ácido fórmico. En general, es conveniente que este ácido sea mono-carboxílico alifático o mono-carboxílico alifático alcohol- o aril- sustituido, como por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido valerianico, ácido caproico o ácido caprílico, siendo preferible el ácido acético. Los ácidos alifáticos que contengan sustituyentes diferentes de los grupos alcohol o arilo no son adecuados para este procedimiento, según indican los autores de la memoria.

²³⁶ Citan como ejemplos el alcohol isopropílico, butanol, alcohol amílico, alcohol bencílico, etanol y alcohol n-octílico; indican que el preferido es el butanol. Rechazan el uso de glicoles divalentes, pues se ha comprobado que son inadecuados, pero es posible emplear éter monoetílico de glicol etilénico.

²³⁷ Los autores han comprobado que si un acetato sódico cristalizado que contenga tres moléculas de agua se calienta con una cantidad apropiada de butanol, se produce un cambio súbito desde la forma de tabletas del acetato sódico a una forma finamente acicular que llena todo el líquido y lo convierte en una sustancia análoga a un gel, que puede utilizarse convenientemente para los fines de la reacción.

²³⁸ Se incluyen en la memoria casi una treintena de ejemplos, 28 para ser exactos; todos de un tenor muy similar a éste: 216,5 g. de la sal de ciclo-hexil-amina de penicilina se suspendieron y disolvieron parcialmente en 1.250 cm³ de butanol; a continuación se añadieron, con agitación, a un 'gel' de 75 g. de acetato sódico cristalizado en 50 cm³ de butanol, a una temperatura de unos 60° C; este 'gel' se preparó por simple calentamiento. Cuando se añadió la sal de ciclo-hexil-amina al 'gel', la mezcla se aclaró y ambos componentes se disolvieron. Al poco tiempo la penicilina sódica comenzó a cristalizarse en forma de placas; al cabo de hora y media la separación aparentemente es completa: se obtuvieron 119 g. con una potencia de 1615 U.I./ mg. Unos 70 g. de este preparado se disolvieron en 280 cm³ de acetona al 90% (v/v), dando origen a una disolución clara; se añadieron 3.080 cm³ de acetona no diluida. La recuperación fue cuantitativa.

En definitiva, se trata de un procedimiento para la preparación de sales alcalinas o amónicas de penicilina, en el cual una sal de penicilina y una base orgánica que no destruye la penicilina y que forma con ella sales cristalizadas, reacciona en presencia de un medio líquido con una sal alcalina o amónica de un ácido alifático que no tenga más de ocho átomos de carbono en la cadena alifática, con exclusión del ácido fórmico. El medio líquido es aquel en el cual la base orgánica de penicilina y la base alcalina o amónica de dicho ácido sean solubles en cierta medida y donde la sal alcalina de penicilina sea prácticamente insoluble.

El 22 de julio de 1948 será la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* quien presentará, ante el registro español, un expediente para proteger, por veinte años, su invención de “Un método para recuperar una sal purificada de penicilina”²³⁹. El procedimiento se refiere, en particular, a sales potásicas y amónicas de penicilina, obtenibles con relativa facilidad en estado purificado, pues se pueden precipitar desde los disolventes orgánicos, quedando las impurezas en la solución. Los autores proponen la adición de un alcoholato a la solución impura de la sal de penicilina, en un disolvente orgánico, en ausencia total de agua y en las cantidades requeridas por la reacción del alcoholato con la penicilina para formar una sal de penicilina con lo que, después de la reacción correspondiente, la sal de penicilina formada tiene que precipitar.

Cuando se parte de una solución anhidra de la sal impura en disolvente orgánico, en lugar de una solución acuosa de dicha sal, y usando un alcoholato para formar una sal de penicilina, como no se origina agua, la precipitación tendrá lugar inmediatamente. Sin embargo, puede ser necesario aumentar la concentración, reducir la temperatura o tener en cuenta otras precauciones similares que favorezcan la cristalización; tales precauciones sirven para que la solución quede sobresaturada. La cantidad de alcoholato que se debe emplear varía entre límites bastante amplios, pero es preciso que la cantidad añadida comprenda la correspondiente a la penicilina y también a las impurezas.

Los autores explicitan una forma práctica de su procedimiento: primero se prepara una solución de una sal de penicilina en un disolvente orgánico con exclusión de toda agua; es conveniente para este fin usar como materia prima una sal de penicilina con una base orgánica débil, a ser posible de naturaleza volátil, estas bases débiles quedan en libertad por la acción de los alcoholatos que, en su mayoría, son bases fuertes y, si son volátiles, se eliminan fácilmente, pues su presencia aumenta la solubilidad de la sal de penicilina o, si la operación es de larga duración, originan una destrucción de la penicilina; esta eliminación se puede realizar por destilación de corta duración o pasando un gas inerte a través de la solución y, si es preciso, a una temperatura algo elevada, con lo cual no hay una destrucción de la penicilina²⁴⁰. A esta solución se le

²³⁹ AHOEPM, patente 184.673; la memoria descriptiva consta de once páginas mecanografiadas, escritas por una sola cara, fechadas en Madrid, a 22-VII-1948. Este expediente se corresponde al presentado en Dinamarca, con fecha de 26-VIII-1947, registrado bajo el número 3.236/47. La empresa figura como establecida en el número 19 de Bronshøjvej, Copenhague (Dinamarca). La patente española, de invención, fue aprobada con fecha de 2-III-1949 y publicada el 1-IV-1949.

²⁴⁰ Entre las bases débiles que pueden emplearse, los autores señalan las aminas terciarias, que tienen la ventaja de carecer de efecto destructor sobre las penicilinas; además, sus sales son, en general, fácilmente solubles en disolventes orgánicos, por ejemplo alcoholes, incluso cuando la sal está impura; son muy convenientes las tri-alcohol-aminas que se encuentran en el mercado y además son volátiles. Como disolvente para la sal impura de penicilina pueden usarse alcoholes anhidros, ya que tienen una buena acción disolvente sobre dichas sales de penicilina.

añade un alcoholato para precipitar la sal de penicilina purificada; se usan preferentemente alcoholatos alcalinos, pues actúan como bases fuertes que liberan con facilidad las bases débiles de la sal impura de penicilina²⁴¹; ha de limitarse el número de componentes de la solución de la cual se separa la penicilina; es conveniente, según los autores de la memoria, usar el alcoholato del alcohol que se empleó para disolver la sal impura de penicilina²⁴². Cuando se realiza la adición del alcoholato a la solución, la correspondiente sal de penicilina cristalizará inmediatamente, o bien la cristalización puede provocarse por enfriamiento brusco o reposo; en algunos casos, la cristalización solamente ocurrirá cuando se haya eliminado la base de penicilina originalmente empleada; si esa base es una sustancia volátil, su eliminación puede llevarse a cabo fácilmente por destilación o pasando un gas inerte a través de la solución. Los autores de esta memoria ilustran su procedimiento con algunos ejemplos²⁴³.

El 23 de febrero de 1949, esta misma empresa danesa, *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentará, ante el registro español, un expediente para solicitar un certificado de adición sobre “Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal”, en referencia a la que apenas unos días antes, había sido presentada en este mismo registro (patente 184.673)²⁴⁴.

El método descrito en la patente principal se basa en una doble descomposición entre la penicilina libre o una sal de penicilina, que tienen carácter ácido, y una sal potásica. La doble descomposición se puede completar hasta obtener un buen rendimiento, a causa de la solubilidad -muy pequeña- de la sal potásica de penicilina. Si como reactivo inicial se emplea penicilina libre, es posible usar una sal potásica de un ácido, que será liberado por la reacción, que no perjudique la penicilina. Si el reactivo inicial es una sal de penicilina, es necesario que la sal formada por doble descomposición sea soluble en alcohol²⁴⁵. Los autores ilustran su procedimiento con algunos ejemplos²⁴⁶.

²⁴¹ Es particularmente ventajoso el alcoholato potásico, ya que la sal potásica de penicilina cristaliza bien y, por consiguiente, se obtendrá en un estado prácticamente puro.

²⁴² Un buen disolvente sería el alcohol butílico anhidro y, por consiguiente, cuando se ha usado este alcohol como disolvente, se emplea preferentemente un alcoholato de metal alcalino del alcohol butílico, obteniéndose rendimientos elevados.

²⁴³ La memoria incluye cinco ejemplos similares a éste: a un litro de una solución impura y anhidra de penicilina en acetato de amilo, que contiene 30.000 U.O./ml., se le añade una solución anhidra al 20% de trimetil-amina en acetato de amilo, hasta que no se separe más aceite. Se deja reposar una hora a baja temperatura, el aceite se separa de la solución y se disuelve en 200 ml. de alcohol etílico anhidro; a la solución de la sal de penicilina con trimetil-amina que se ha obtenido se le añade 1,5 veces la proporción de una solución de etilato potásico en alcohol etílico anhidro, que es necesaria para convertir la sal de trimetil-amina en sal potásica. La amina que ha quedado libre se elimina calentando la solución a 35° C, mientras se pasa nitrógeno seco a través de la solución. Al cabo de unos minutos la sal potásica de penicilina se separa por cristalización, después de lo cual la solución se enfría bruscamente a 0° C durante dos horas y los cristales se separan por filtración. El rendimiento obtenido es del 62%.

²⁴⁴ AHOEPM, patente 187.178; la memoria descriptiva consta de cinco hojas, escritas a máquina por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 23 de febrero de 1949. Esta solicitud se corresponde a la presentada en Dinamarca el 26-II-1948, con el número de registro 621/48. La empresa figura como establecida en el número 19 de Bronshøjvej, Copenhague (Dinamarca). Este certificado de adición fue concedido el 24-II-1949 y publicado el 16-IV-1949.

²⁴⁵ Los autores señalan que, cuando se emplea una solución de penicilina o una sal de penicilina en un alcohol diferente del etanol (alcohol anhidro), suponiendo que se emplea también una sal potásica, ésta debe ser soluble en el alcohol utilizado. Como ejemplos de alcoholes alifáticos inferiores señalan:

El 11 de noviembre de 1948 es de nuevo la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* quien presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, una invención relativa a “Un procedimiento para producir la sal sódica o cálcica de penicilina en forma o no de solución, partiendo de la sal potásica de la penicilina”²⁴⁷.

El proceso trata de mejorar los rendimientos de obtención de sales cálcicas y sódicas de penicilina. Para ello parte de una solución de sal potásica de penicilina, mezclada con una sal sódica o cálcica solubles en el mismo disolvente que la sal potásica; esta nueva mezcla se hace reaccionar con un ácido que forma con el potasio una sal poco soluble en el disolvente empleado, con lo cual -según los autores de la memoria- se separa la sal potásica por precipitación, consiguiendo con ello la obtención de la sal sódica o cálcica con un rendimiento mucho mejor que el procedimiento hasta este entonces conocido.

Puede que, en algunos casos, sea conveniente obtener la sal sódica o cálcica de penicilina en solución acuosa; para ello, una solución acuosa de la sal potásica de penicilina se mezcla con una solución acuosa de una sal sódica o cálcica de un ácido que forme una sal potásica poco soluble en agua; si la sal sódica o cálcica fuesen añadidas en proporciones equivalentes a la sal potásica de penicilina que hay en la solución acuosa y eligiendo una temperatura adecuada, la precipitación de la sal potásica se hace lo más completa posible. Se obtendría así una solución libre de sal potásica que se podría administrar por vía oral o, si se esteriliza, por vía parenteral.

Es posible usar esta solución acuosa como material de partida en procedimientos ya conocidos, en los cuales la sal sódica o cálcica ha de recuperarse en estado cristalino. Esta reacción puede llevarse a cabo en diversos disolventes; el más adecuado es el metanol, que puede emplearse en forma completamente anhidra, con lo cual la separación de la sal sódica o cálcica en estado cristalino, después de la reacción con la sal añadida, y separación de la sal potásica formada, es fácil de realizar. Después de separar la sal potásica puede añadirse un disolvente en el cual la sal sódica o cálcica sea menos soluble -y menos volátil- que en metanol; con ello es posible destilar la mezcla en el vacío, hasta que el metanol se ha separado o el disolvente añadido se ha

propanol, isopropanol, N-butanol y varios isómeros del mismo alcohol alílico. La patente principal cita como ejemplos de sales adecuadas para la doble descomposición: acetato potásico, formiato potásico y sulfacianato potásico; estas mismas sales se pueden emplear, también, de acuerdo con el presente procedimiento, con tal que sean solubles en el alcohol utilizado.

²⁴⁶ Incluye la memoria un par de ejemplos; dejamos anotado el primero de ellos: se extractan, mediante 150 ml. a pH 2,2, una cantidad de 100 ml. de una solución acuosa de la sal sódica de penicilina, con una concentración de 126.00 unidades/ml., y un grado de pureza de 400 U.O./mg. La capa etérea se ha de secar con sulfato sódico y, a continuación, se mezcla con 150 ml. de butanol seco. Inmediatamente el éter se separa por destilación en vacío a una temperatura de 10°-20° C; al residuo que se forma se le añade una solución de 8 g. de acetato potásico en butanol (la solución saturada tiene una molaridad de ca. 0,5). La mezcla se enfría hasta una temperatura de 0° C y a esta temperatura se mantiene durante doce horas. La sal potásica de penicilina precipita y se retira por filtración, se lava con butanol frío y se seca. Se obtienen 5,8 g., que poseen una potencia de 1.400 U.O./mgr, con un rendimiento del 65%.

²⁴⁷ AHOEPM, patente 185.882; la memoria descriptiva, de siete hojas escritas por una sola cara, queda firmada, en Madrid, a 11 de noviembre de 1948. La solicitud se corresponde a la presentada por la misma empresa en Dinamarca, el 10-XII-1947, bajo el número 4579/47. La empresa consta como establecida en 19 Bronshøjvej, Copenhague (Dinamarca). La patente española fue concedida con fecha 3-I-1949 y publicada el 1-II-1949.

concentrado tanto que la sal sódica o cálcica cristalicen, o bien se separen en estado sólido al enfriar y dejar en reposo.

Existe otra forma de proceder, consistente en que, después de separar la sal potásica, se añade un disolvente que puede unirse con el metanol y en el cual la sal sódica o cálcica sea poco soluble, con lo cual se consigue que esta sal cristalice o precipite; en este caso, el disolvente no necesita ser menos volátil que el metanol²⁴⁸. En la memoria descriptiva se añaden un par de ejemplos prácticos²⁴⁹.

El 4 de marzo de 1949 entraría en registro el expediente por el que la empresa norteamericana *Merck & Co.* solicita patentar, por un período de veinte años, su invención sobre “Un procedimiento para el aislamiento y purificación de penicilina G”²⁵⁰. La propuesta supone tratar una solución de ácido penicilínico en un disolvente orgánico con una solución de una amina heterocíclica N-sustituida, para formar la sal amínica terciaria de la penicilina G, recuperar esta última combinación, disolver la sal en una mezcla orgánica acuosa, hacer reaccionar esta última mezcla con un hidróxido alcalino y recuperar la correspondiente sal alcalina de penicilina G de la fase acuosa.

Las soluciones de penicilina G que se tratan por este procedimiento pueden provenir de operaciones previas de aislamiento o pueden ser preparadas disolviendo en agua una sal de penicilina, acidificando y extrayendo en un disolvente inmiscible²⁵¹.

De acuerdo con una de las realizaciones referida por los autores de este procedimiento, la penicilina sódica se disuelve en agua y la solución se diluye con acetato amílico; la mezcla se lleva a un pH 2.7 mediante la cantidad adecuada de ácido fosfórico; esta reacción, y las siguientes, se han de realizar a una temperatura próxima a 0° C, para evitar la descomposición de la penicilina. La penicilina sódica se convierte en ácido penicilínico libre y se extrae con acetato amílico. Los líquidos inmiscibles se separan y la capa acuosa se trata con más acetato amílico y ácido fosfórico, recuperando así cualquier penicilina activa que pueda quedar en la capa acuosa. Los extractos de acetato amílico se combinan, se lavan y secan con sulfato sódico anhidro y la solución se diluye con acetona. La mezcla de acetato amílico y acetona que contiene el ácido penicilínico se hace reaccionar con N-etil-piperidina disuelta en acetona; la mezcla se

²⁴⁸ Ejemplos de disolventes que pueden usarse: alcoholes como n-propanol, isopropanol o los butanotes; ésteres tales como etil-acetato, butil-acetato o amil-acetato; éteres como dietiléter, di-isopropanol-éter, di-iso-amil-éter o dioxano.

²⁴⁹ Recogemos el primero de ellos: en 70 cm³ de metanol seco, se disuelven 6.2 g. de la sal potásica de penicilina y se le añade una solución de 2 g. de perclorato sódico en 10 cm³ de metanol. Se deja reposar durante una hora a una temperatura de 0° C. El perclorato separado de la solución se retira por filtración. El filtrado se mezcla con 40 cm³ de butanol seco y la mezcla resultante se destila al vacío, manteniendo la temperatura por debajo de 30° C. Cuando el metanol se ha evaporado, cristaliza la sal sódica de penicilina. El procedimiento tiene un rendimiento en torno al 85%-90%.

²⁵⁰ AHOEPM, patente 187.312; la memoria descriptiva consta de diecinueve hojas, escritas mecanográficamente por una sola cara y firmadas, en Madrid, a 21-V-1949. La entidad figura como establecida en el 126, East Lincoln Avenue, Rahway (New Jersey. EE. UU.). La patente, de invención, fue concedida el 8-VI-1949 y publicada el 16-VII-1949.

²⁵¹ Es posible emplear cualquier solución de disolvente orgánico, siempre que la sal amínica heterocíclica N-sustituida de la penicilina G sea insoluble en ella. Los autores prefieren el acetato amílico, el éter o una mezcla de acetato amílico y acetona como disolvente. Ejemplos de aminas heterocíclicas N-sustituidas, adecuadas para el presente procedimiento son: N-metil-piperidina, N-etil-piperidina, N-metil-morfolina y N-etil-morfolina.

agita durante una hora, completándose la cristalización de la sal N-etil-piperidínica de penicilina G. Se recuperan los cristales de amarillo pálido, se secan por absorción y finalmente en el vacío a 25 ° C.

La N-etil-piperidina es un precipitante cuantitativo de la penicilina G. La N- etil-piperidina de penicilina G obtenida por este procedimiento, según sus autores, es esencialmente pura, aunque contiene cantidades pequeñas de pigmentos, en función de la pureza del material de partida.

Varios son los procedimientos para la purificación de la sal de N-etil-piperidínica de la penicilina. Según un método, la sal N-etil-piperidínica bruta de penicilina G se cristaliza de una solución de cloroformo y acetona, esto se produce disolviendo primero la sal en cloroformo; la solución que se forma se trata con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, extrayéndose la mayoría de las impurezas de pigmentos con cantidades insignificantes de penicilina de la capa acuosa. Las capas se separan y la solución de cloroformo se concentra a pequeño volumen. La solución de cloroformo concentrada de la sal N-etil-piperidínica de penicilina se trata luego con acetona y la mezcla se deja en reposo una hora, después de lo cual precipita la sal N-etil-piperidínica de penicilina G.

Otro método para conseguir la cristalización de la sal N-etil-piperidínica bruta de penicilina G consiste en tratar una solución de la sal en cloroformo con una solución de cloruro sódico. La solución en cloroformo y las soluciones acuosas se separan y la de cloroformo se trata con butanol. El cloroformo se separa por evaporación y la sal N-etil-piperidínica precipita del butanol. Esta reacción se puede también realizar suprimiendo el tratamiento previo con cloruro sódico. La sal N-etil-piperidínica de penicilina G obtenida es aceptablemente pura, pero si se quiere una ulterior purificación se puede volver a cristalizarla disolviéndola en cloroformo, concentrando la solución a pequeño volumen y diluyendo con acetona.

La conversión de la sal N-etil-piperidínica de penicilina G a penicilina sódica o penicilina cálcica G se realiza disolviendo en agua la sal N-etil-piperidínica y adicionando acetato amílico. El pH de la solución se ha de fijar en 6.5, por lo que es necesario añadir el suficiente hidróxido sódico o cálcico diluido; el álcali se debe añadir en tal proporción que la temperatura de reacción no rebase los 30° C. Operando de esta forma, se puede extraer penicilina sódica o cálcica en la capa acuosa y la N-etil-piperidina se extrae en el acetato amílico. Las dos capas se han de separar; la capa acuosa se lava con acetato amílico; la penicilina sódica amorfa que se encuentra en la solución acuosa se puede recuperar por congelación de ésta y posterior secado al vacío. El producto obtenido es prácticamente puro. Como la N-etil-piperidina es soluble en acetato amílico se puede recuperar de la capa de éste. La penicilina sódica amorfa se cristaliza disolviéndola en butanol; inmediatamente comienza la cristalización.

Si el material de partida hubiese sido una penicilina de potencia muy baja (de 200 U.I./mg. a 400 U.I./mg.) y además tuviese muy mal color, los autores recomiendan un tratamiento previo con piridina. Para realizar este tratamiento hay que diluir una solución acuosa de penicilina de baja potencia con éter, fijar el pH de la reacción a 2,5 y luego tratar la solución etérea con piridina. La piridina expulsa las impurezas y la capa aceitosa que las contiene se separan. La capa etérea que contiene la penicilina prácticamente purificada se hace reaccionar con otra solución etérea de una amina

heterocíclica N-sustituida para precipitar la sal amínica heterocíclica N-sustituida de la penicilina G. Los autores exponen unos ejemplos para ilustrar su procedimiento²⁵².

²⁵² Un total de cuatro ejemplos; comentamos el primero de ellos: una solución de penicilina sódica clínica (actividad 250 U.I./mg.), que contiene 250 g. del producto indicado disuelto en 120 cm³ de agua destilada, se enfría a 0 ° C en un baño de hielo, con agitación; a continuación se diluye con 120 cm³ de acetato amílico frío, el pH de la solución agitada fría (0° C) se ajusta a 2.7 mediante una solución de 6.0 cm³ de ácido fosfórico al 85% en 44 cm³ de agua. La mezcla se separa y la capa acuosa se trata con 25 cm³ de acetato amílico frío y suficiente solución de ácido fosfórico para regular el pH de la solución a 2.5. Para impedir la descomposición de la penicilina, es necesario mantener frías la solución de acetato amílico y la capa acuosa, en todo el tiempo. Las capas se separan y el acetato amílico se combina con el extracto original; esta extracción se repite con 25 cm³ más de acetato amílico. Los extractos combinados se lavan con 25 cm³ de agua destilada fría y se secan agitando con suficiente sulfato sódico anhidro (10-15 g.), obteniéndose una solución diáfana. El sulfato sódico se separa por filtración y se lava formando un lodo en el filtro con 10 cm³ de acetato amílico frío. El bioensayo de las soluciones acuosas obtenidas de la extracción y la operación de lavado no mostró importante actividad penicilínica. A la solución de acetato amílico fría, que contiene ácido penicilínico, se le añaden 140 cm³ de acetona fría. A esta solución fría se le añade otra solución fría de 8,0 g. de N-etil-piperidina en 40 cm³ de acetona. Se regula el pH de la solución a 7. La mezcla se agita durante una hora, terminado así la cristalización de la sal N-etil-piperidínica granular de penicilina G. La cristalización se puede favorecer añadiendo cristales de la sal N-etil-piperidínica de penicilina G a la solución, tras añadir un 20% de la solución de N-etil-piperidina. La solución se filtra y los cristales obtenidos se mezclan con 25 cm³ de acetona. Se vuelve a filtrar y se le vuelve añadir 25 cm³ de acetona. El producto cristalino se absorbe durante una hora bajo un dique de goma y, finalmente, se seca a 25° C en el vacío. Se obtuvieron 15.95 g. de un producto granular, amarillo, de una rotación óptica de (alfa) D//25 227° medido en solución conteniendo un 50% de agua y con una actividad de 1.327 U.I./mg., lo que represente un 89% de recuperación de actividad.

La N-etil-piperidina es un precipitante esencialmente cuantitativo para la penicilina G, pero la recuperación de la actividad en este aspecto varía según el contenido de penicilina G. La cristalización de la sal N-etil-piperidínica impurificada de penicilina G se realiza disolviendo 20,0 g. de la sal impurificada en 83 cm³ de cloroformo. La solución, de color amarillo, se extrae con una solución saturada de cloruro sódico; la mayor parte del color se concentra en las capas acuosas. Los extractos acuosos combinados se lavan dos veces con porciones de 10 cm³ de cloroformo y los extractos de cloroformo se secan sobre 5-10 g. de sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra al vacío a un volumen aproximado de 40 cm³. La mezcla se diluye con 100 cm³ de acetona y se enfría a 0° C durante una hora, con lo cual precipita la sal N-piperidínica de penicilina G. Los cristales se separan de la solución por filtrado, se forma dos veces un lodo con un volumen mínimo de acetona y se secan a 25° C en el vacío. Los cristales así formados tiene un punto de fusión de 156°-157° C con descomposición y una rotación óptica de (alfa) D//25 239° medidos en solución al 50% de agua. Se recuperaron 17,2 g. de sal prácticamente pura, lo cual representa un 86%. Se puede obtener una nueva cantidad de la sal concentrando a 3-4 cm³ de volumen y diluyendo con 30 cm³ de acetona; se obtuvieron así unos 0,43 g. del producto indicado, que presentaron la misma rotación óptica que en el caso anterior; toda la masa de cristales obtenidos supone una recuperación del 88,15%.

Un método alternativo de cristalizar la sal N-etil-piperidínica impura de penicilina G consiste en tratar la sal con cloroformo y butanol. Se procede como se indica continuación: 100 g. de sal N-etil-piperidínica impura de penicilina G, obtenida como se ha indicado más arriba, se disuelven en 450 cm³ de cloroformo, se tratan con carbón vegetal activado y se diluyen con 500 cm³ de butanol; a continuación la mezcla se concentra al vacío hasta eliminar todo el cloroformo. Toda la sal N-etil-piperidínica de penicilina G cristaliza. La mezcla se enfría a 0° C durante 40 minutos, se filtra y lava tres veces con porciones de 100 cm³ de butanol frío. Luego se vuelve a lavar dos veces más con porciones de 100 cm³ de acetona. El producto, incoloro, se seca a 25° C en el vacío. Se puede obtener una cantidad complementaria del producto concentrando en el vacío unos 75 cm³, añadiéndoles salmuera, filtrando, lavando con acetona y secando al vacío. Las cantidades obtenidas del producto deseado fueron: en el primer caso 81,7 g., el segundo caso 7,80 g.; en conjunto representa una recuperación del 89,5%. Los cristales tenían una rotación óptica de (alfa) D//25 239°, medidos en solución al 50% en agua, y un punto de fusión de 156°-157 ° C con descomposición. El tratamiento de una solución en cloroformo de la sal N-etil-piperidínica de penicilina G con salmuera, como se ha descrito, seguida de una dilución con butanol y posterior concentración, origina un producto incoloro con rendimiento de 83,6%. Los cristales obtenidos

En el mismo acto de presentación del anterior expediente, el 4 de marzo de 1949, la misma firma, *Merck & Co.*, presentó ante el registro un nuevo expediente para proteger, por veinte años, su invención sobre “Un procedimiento de fabricar sales de penicilina G”²⁵³.

Los autores de este procedimiento indican que las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos de la penicilina G pueden separarse fácilmente de las sales amínicas, con rendimiento prácticamente cuantitativo, usando reactivos que sean virtualmente neutros. Tal hecho se consigue al hacer reaccionar la sal amínica de penicilina G y una sal de metal alcalino o alcalinotérreo en solución en un líquido orgánico. Las sales metálicas de penicilina G son prácticamente insolubles en líquidos orgánicos, la sal metálica de penicilina G que se ha formado por la reacción dicha normalmente precipita y se recupera por los métodos conocidos. La penicilina G es estable en las condiciones de reacción indicadas.

De manera tradicional se pensaba que la interconversión de sales de penicilina era necesario realizarla por métodos que implicasen refrigeración. Al realizar este procedimiento se comprobó que era posible conseguir la reacción a temperaturas de 25° C, o aún más, sin que se apreciase descomposición de la penicilina G. Este

presentaron una rotación óptica de (alfa) D//25 239° medidos en solución al 50% en agua y un punto de fusión de 156°-157 ° C con descomposición.

En general, la sal N-etil-piperidínica de penicilina G se obtiene pura y está prácticamente libre de pequeñas cantidades de pigmentos; pero si se usan materiales de partidas menos potentes es necesaria una segunda cristalización para separar los últimos contaminantes coloreados. Esto se consigue operando del siguiente modo: una parte de la sal N-etil-piperidínica de penicilina G se disuelve en unos 6 cm³ de cloroformo; la solución se concentra en el vacío a un volumen de unos 2 cm³ y se diluye con 18 cm³ de acetona. La mezcla se enfría en un baño de hielo a 0° C durante una hora y precipita la sal N-etil-piperidínica de penicilina G; luego la mezcla se filtra y, con los cristales obtenidos, se hace lodo con un volumen mínimo de acetona. El producto, incoloro, se seca a 25° C en vacío. Se consigue una recuperación del 96%.

La sal N-etil-piperidínica de penicilina G se convierte en penicilina sódica pura disolviendo 6.0 g. de la sal N-etil-piperidínica pura en 35,8 cm³ de agua fría (sin dióxido de carbono) y cubriendo la capa acuosa con 57 cm³ de acetato amílico frío. La mezcla se agita a 0° C y se trata con 13,5 cm³ de hidróxido sódico 0.9955 N (sin carbonato). El álcali se añade en tal medida que no se rebase la temperatura de 30° C. Las dos capas se separan y la acuosa se extrae, dos veces, con 35 cm³ de acetato amílico frío. La capa acuosa, cuyo pH es de 7, se congela y seca en el vacío, para obtener 4,78 g. de penicilina sódica incolora y esencialmente pura. El producto tenía una rotación óptica de (alfa) D//25 292,5°, determinada en una disolución formada por 1.000 mg. en 25 cm³ de agua. El bioensayo mostró una potencia de 1.652 U.I./mg. Si se usa hidróxido cálcico, en vez del sódico, se obtiene penicilina G cálcica pura. Los resultados anteriores representan una recuperación general del 76% de la actividad de la penicilina clínica como penicilina sódica. Se realizó el análisis del producto cuya fórmula empírica es C₁₆H₁₇N₂SO₄Na y los resultados fueron lo siguientes: análisis calculado: C (53,93%), H (4,81%), N (7,86%); análisis encontrado: C (54,08%), H (5,02%), N (7,74%). La N-etil-piperidina se recupera de la capa de acetato amílico añadiendo ácido clorhídrico 2.5 N al acetato amílico. hasta una acidez indicada por el rojo congo. Las capas se separan y la acuosa se hace alcalina con hidróxido sódico. La N-etil-piperidina se separa, se seca sobre lentejuelas de hidróxido potásico y se destila a la presión atmosférica. La cristalización de la penicilina sódica G se realiza agitando una mezcla de 5,0 g. del producto y 15 cm³ de butanol hasta que la penicilina sódica se disuelve y luego cristaliza de la solución. La mezcla se enfría a 0° C durante cinco horas, se filtra, se reduce a lodo dos veces con un volumen mínimo de acetona y se seca en el vacío. Se obtienen 4,66 g., lo que representa un 93,2% de recuperación de penicilina sódica cristalina G.

²⁵³ AHOEPM, patente 187.313; la memoria descriptiva consta de dieciséis hojas escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 21-V-1949. La entidad figura como establecida en el 126, East Lincoln Avenue, Rahway (New Jersey. EE. UU.). La patente española sería concedida el 23-V-1949 y publicada el 16-VII-1949.

procedimiento obtiene la sal sódica y otras sales de metales alcalinos de la penicilina G sin la operación costosa de congelar y secar.

Los reactivos iniciales que se emplean en este proceso incluyen las sales de penicilina G con aminas alquílicas, como por ejemplo la N-metil-piperidina, N-etil-piperidina o N-etil-morfolina; los autores indican que prefieren usar las sales amínicas terciarias de penicilina G, porque estas combinaciones se pueden preparar fácilmente en forma pura. Como disolvente de reacción debe emplearse un líquido orgánico polar que sea neutro, anhidro y no reaccione con la penicilina G; estos líquidos poseen acción disolvente sobre las sales amínicas de la penicilina G y sobre los reactivos de sales de metales alcalinos y alcalinotérreos²⁵⁴. Para que la reacción se realice adecuadamente es conveniente utilizar sales de metales alcalinos o alcalinotérreos que tengan una solubilidad, en el líquido orgánico empleado, superior a la solubilidad de la correspondiente sal metálica de penicilina G.

Cuando un reactivo de una sal de un metal alcalino o alcalinotérreo, del tipo mencionado, se hace reaccionar con una sal amínica de la penicilina G, empleando sólo el líquido orgánico suficiente para producir una solución virtualmente saturada de dicho reactivo de sal metálica²⁵⁵, la sal metálica de penicilina G que se forma por metátesis precipita y la reacción continúa debido a la acción de la masa, hasta terminar. La reacción conviene realizarla añadiendo una solución de uno de los reactivos, con agitación, a la otra solución que contiene el otro reactivo, con lo cual la sal de metal alcalino o alcalinotérreo de penicilina G, formada por la reacción, suele precipitar y se puede recuperar por los medios usuales.

La sal cristalina de metal alcalino y alcalinotérreo de penicilina G se puede recuperar por filtrado o centrifugación. Se debe lavar a fondo con el disolvente de reacción y, en su defecto, con otro líquido orgánico anhidro que sea un disolvente de la sal amínica formada por metátesis como producto secundario. Se ha de secar a la temperatura ambiente o a una temperatura superior a ella, preferentemente esta operación se hace al vacío, para obtener prácticamente pura la sal de metal alcalino o alcalinotérreo de penicilina G. El producto se puede purificar aún más si se vuelve a cristalizar en un disolvente, tal como una dialquil-cetona acuosa. La memoria incluye algunos ejemplos donde se exponen métodos realizados por este procedimiento²⁵⁶.

²⁵⁴ Preferentemente se usan disolventes clorados, tales como el cloroformo, éteres beta, beta-dicloro, dialquílicos y similares, ésteres como acetato etílico, alcoholes como butanol, 2-etil-butanol y similares, nitrilos tales como el aceto-nitrilo, así como mezclas que contienen dos o más disolventes distintos. En realidad, cualquier combinación de metal alcalino o alcalinotérreo es un reactivo adecuado, siempre que el anión de la misma no sea reactivo con la penicilina G, ya que las combinaciones de esta clase dan una solución que contiene los correspondientes cationes cuando se mezclan con líquidos orgánicos polares.

²⁵⁵ Las sales metálicas utilizadas suelen ser halogenuros de los metales alcalinos y alcalinotérreos, como yoduro sódico, yoduro potásico, cloruro lítico, bromuro cálcico y similares; sales de metales alcalinos de ácidos carboxílicos alifáticos, tales como el acetato sódico hidratado, 2-etil-hexoato sódico, 2-etil-hexoato potásico y similares.

²⁵⁶ La memoria descriptiva incluye un total de 22 ejemplos; nos limitamos a comentar el primero de ellos: se mezclan dos soluciones, una de ellas formada por 5 g. de sal N-etil-piperidínica de penicilina G disueltos en 30 ml. de cloroformo y la otra por 1,68 g. de yoduro sódico disueltos en 30 ml. de acetona. Inmediatamente comienza la cristalización; al cabo de dos días se separó, por filtración, la penicilina G sódica cristalina e incolora; fue lavada a fondo con acetona y secada al vacío. Se obtuvo un peso de 3,84 g. con un rendimiento del 96% del máximo teórico. Se realizó un bioensayo contra *Staphylococcus aureus* (1.654 U.I./mg.), la rotación óptica fue de (alfa) 23//D + 285°, y los análisis para C₁₆H₁₇O₄NS₂N fueron: calculado: C (53,93%), H (4,81%), N (7,86%) y encontrado: C (54,06%), H (4,84%), N (7,72%).

El 12 de mayo de 1949 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para que le fuera reconocida la protección, por veinte años, de “Un procedimiento para producir sales de penicilina”²⁵⁷. Los autores de esta patente creen poder producir una sal en estado cristalino, por precipitación de una solución de penicilina libre, en un disolvente orgánico; la sal cristalina de penicilina que así se ha obtenido puede emplearse como material primario para obtener nuevos preparados de penicilina o bien puede ser el producto final del proceso, entonces conviene lavarlo con un disolvente orgánico o volver a cristalizarlo, si eso fuese necesario.

Según estos autores, la penicilina presente en una solución de un disolvente orgánico se precipita añadiendo piridinas, entendiéndose por tales la propia piridina, sus homólogos o los productos que la contienen. Para lograr una buena cristalización de las sales de penicilina con piridinas conviene añadir un disolvente en el cual la sal de penicilina tiene que ser menos soluble que en el disolvente empleado para lograr la disolución de la piridina libre; un buen ejemplo de disolvente añadido es el éter de petróleo. Es posible usar la misma piridina como precipitante, formándose una sal piridínica de penicilina en forma cristalina, estable y muy pura²⁵⁸.

Con fecha de 18 de mayo de 1949, esta misma entidad danesa, *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, presentó ante el registro español la solicitud de una patente de invención para proteger, por veinte años, “Un método para producir penicilina libre y sales de penicilina”²⁵⁹; éste tiene como finalidad la conversión de ciertas sales de penicilina, como por ejemplo la sal potásica o amónica, o sales de ciertas aminas terciarias como la trietil-amina, en otras sales tales como la sal sódica, cálcica o la penicilina libre.

Los autores parten de una solución de una sal de penicilina, preferentemente en un disolvente anhidro o casi anhidro que sea polar, como un alcohol, o una mezcla de tales disolventes entre sí o con un disolvente no polar, como el cloroformo, en contacto con una sustancia de permutación catiónica, cargada con un catión cuya sal de penicilina se desea producir, o con iones de hidrógeno si ha de originarse penicilina libre. La conversión de las sales usadas como materiales de partida en la sal deseada, o

²⁵⁷ AHOEPM, patente 188.188; la memoria descriptiva consta de cinco páginas mecanografiadas, escritas por una sola cara, fechadas en Madrid, a 12-V-1949. Este expediente se corresponde al presentado en Dinamarca, con fecha de 21-V-1948, registrado bajo el número 1.677/48. La empresa figura como establecida en el número 19 de Bronshøjvej, Copenhague (Dinamarca). La patente española, de invención, fue aprobada con fecha de 12-V-1949 y publicada el 1-VII-1949.

²⁵⁸ Los autores exponen un ejemplo práctico: un volumen de 6,6 ml. de piridina se añade a 160 ml. de una solución seca de penicilina en amil-acetato que contiene 138.000 U.I./ml.; a la mezcla obtenida se le añade éter de petróleo hasta que la solución se enturbie, al tocarla con una varilla de vidrio comienza la cristalización, en este momento se le adiciona una nueva cantidad de éter de petróleo (320 ml.). La sal cristalina de penicilina con piridina se separa por filtración, se lava con éter de petróleo y se seca; se obtienen 14 g. de la sal, cuyo grado de pureza es de 1.400 U.I./mg., con un rendimiento 88% del teórico.

²⁵⁹ AHOEPM, patente 188.260; la memoria descriptiva consta de nueve hojas, escritas por una sola cara, firmadas, en Madrid, el 18-V-1949. Esta solicitud se corresponde a la presentada en Dinamarca, el 19-V-1948, bajo el número 1.654/48. La empresa figura como establecida en el número 19 de Bronshøjvej, Copenhague (Dinamarca). La patente española, de invención, fue otorgada el 19-V-1949 y hecha pública el 1-VII-1949.

en penicilina libre, ocurre fácilmente y sin pérdidas, y las sales de penicilina -o la penicilina libre- así obtenidas pueden usarse en solución o bien la solución puede ser tratada para obtener, si así se desea, un producto cristalino. El producto que se obtiene por la permutación iónica cristaliza directamente desde la solución cuando ésta se separa. Entre los alcoholes empleados como disolventes polares resultan adecuados los alcoholes alifáticos inferiores, tales como metanol, etanol, propanol y butanol. El método es aplicable tanto con sales de penicilina solubles en agua como con sales no hidrosolubles, con tal de que sí sean solubles en el disolvente usado.

El método operativo es el siguiente: se disuelve el material de partida en el disolvente orgánico; la solución se hace pasar a través de una columna de una sustancia de permutación iónica en su forma sódica²⁶⁰; la sustancia de permutación iónica aporta los cationes de sodio, que sustituirán a los cationes de la solución, de forma que se obtiene una solución sódica de penicilina. Si la sustancia de permutación iónica se usase cargada con iones de hidrógeno se obtendría una solución de penicilina libre. A partir de la solución de la sal sódica se puede obtener la sal sódica cristalizada, añadiendo un disolvente en el cual sea insoluble o escasamente soluble la sal sódica, al menos en ciertas condiciones, por ejemplo en frío; el disolvente que se añade puede ser éter, acetato de amilo o alcoholes superiores, por ejemplo butanol o alcohol amílico, si estas sustancias no se han empleado como disolventes.

La permutación iónica puede también realizarse a temperatura relativamente elevada y la cristalización llevarse a cabo enfriando la solución obtenida por el proceso de permutación iónica, método que es preferible emplear en el caso de que se haya usado butanol como disolvente.

El rendimiento del proceso es alto, incluso cuando el producto ha de obtenerse en forma cristalizada. Es posible lograr un 90% de la penicilina en forma de sal sódica cristalina. Los autores acompañan la memoria con algunos ejemplos ilustrativos del proceso²⁶¹.

El 22 de octubre de 1949 se presentó a registro el expediente promovido por la entidad norteamericana *Schenley Industries Inc.*, destinado a proteger, por veinte años, “Un método para producir sales alcalinas de penicilina”²⁶². Un objetivo de este procedimiento es producir sales alcalinas de penicilina cristalizada, puras e incoloras,

²⁶⁰ En principio es posible usar, como sustancia de permutación iónica, cualquier producto capaz de producir esta acción, pero son especialmente útiles las sustancias orgánicas permutadoras de iones producidas a partir de resinas artificiales.

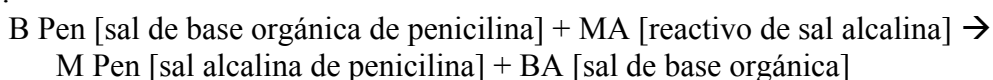
²⁶¹ Incluye la memoria cuatro ejemplos; anotamos el primero de ellos: en 50 cm³ de metanol anhidro, se disuelven 3 g. de la sal potásica de penicilina que contiene 1.400 U.I./mg. La solución se hace pasar a través de una columna formada por 12 g. de la sustancia orgánica permutadora de iones que se encuentra en el comercio bajo el nombre de ‘Amberlite 1 R-1’ en la forma sódica; la columna es de 15 cm. de longitud y 1,8 cm. de diámetro; la solución pasa a través de ella a razón de 3 cc./minuto. La columna se lava luego con 250 cm³ de metanol. La fracción de metanol que contiene la sal de penicilina se precipita mediante cuatro volúmenes de éter seco. La sal de penicilina se separa por cristalización y, posteriormente, se seca. Se obtienen así 2,3 g. de la sal sódica de penicilina, con un grado de pureza de 1.640 U.I./mg., lo que representa un rendimiento equivalente al 87% del teórico posible.

²⁶² AHOEPM, patente 190.142; la memoria descriptiva consta de veintiséis hojas, escritas por una sola cara, firmadas en Madrid, a 22-X-1949. Esta solicitud se corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 23-X-1948, bajo el número 56.252/48. La empresa figura como establecida en 350 Fifth Avenue, Nueva York (EE. UU.). La patente española, considerada como de invención, fue aprobada el 16-XI-1949 y publicada el 1-I-1950.

partiendo de preparados impuros que contienen penicilina. También es objeto de él obtener sales alcalinas de penicilina con un mayor contenido de bencil-penicilina (penicilina G) que los preparados impuros que contienen penicilina²⁶³. Los autores señalan que pueden producirse, con buen rendimiento, sales alcalinas puras de penicilina cuando se hacen reaccionar sales de base orgánica de penicilina con sales alcalinas seleccionadas en ciertas condiciones²⁶⁴.

En los finales de la década de 1940, la formación de sales de base orgánica de penicilina era ya conocida²⁶⁵; los autores citan el siguiente ejemplo: la sal de trietil-amonio, la sal N-etil-piperidínica o la sal de ciclo-hexil-amina se han formado haciendo reaccionar soluciones de penicilina en éter o acetato de amilo con trietil-amina, N-etil-piperidina o ciclohexil-amina, respectivamente. Pero estas sales de base orgánicas, en contraste con la mayoría de las sustancias no penicilínicas, son poco solubles en sus mezclas de reacción y, por lo tanto, sólo ofrecen un medio para la separación parcial de las impurezas presentes. La separación de las impurezas no es completa y las sales de las de bases orgánicas poseen color amarillo debido a las impurezas. Estas sales de base orgánica no se han considerado formas aceptables para la administración terapéutica de la penicilina y, hasta entonces, no se conocía un proceso de conversión, salvo por métodos de extracción con disolventes.

Los autores proponen que las sales de bases orgánicas de penicilina²⁶⁶ pueden, en ciertas condiciones, reaccionar directamente con sales alcalinas de ácidos orgánicos²⁶⁷ para formar sales alcalinas de penicilina de un grado de pureza bastante elevado. El procedimiento implica una reacción de doble descomposición en una solución en disolvente orgánico, cuya reacción puede representarse por la ecuación siguiente:



²⁶³ Aclaran los autores que utilizan la palabra ‘penicilina’ para referirse a las sustancias antibióticas solubles en disolventes orgánicos, producidas por *Aspergillus flavus*, *Penicillium notatum* o *Penicillium chrysogenum*, sin limitación en cuanto a la estructura química individual de tales productos; hará referencia a las penicilinas individuales de acuerdo con la designación propuesta por el *Committee on Medical Research*, O.S.R.D. (Washington) y el *Medical Research Council* (Londres), publicada, en 21-XII-1945: “Chemistry of Penicillin”. *Science*, 102: 627-629. Washington DC, 1945, que es la que se indica a continuación: penicilina X = p-hidroxil-bencil penicilina, penicilina G = bencil-penicilina, penicilina F = (delta)-pentenil penicilina, penicilina dihidro-F = N-amil penicilina y penicilina K= N-heptil penicilina.

²⁶⁴ Señalan los autores que utilizan el vocablo ‘álcali’ para aludir a cualquiera de los metales monovalentes del grupo I de la tabla periódica entonces vigente: litio, sodio, potasio, rubidio y cesio. Se incluye en la denominación de álcali el amonio, íntimamente afín a los metales alcalinos en muchas propiedades químicas y físicas (Cf. Robert Martin CAVEN, George Druce LANDER. *Systematic inorganic chemistry from the standpoint of the periodic law: a text-book for advanced students*. Londres: Blackie & Son, 1931 -pág. 103, fide AHOEPM, patente 190.142-).

²⁶⁵ Incluso se habían registrado patentes de este tipo de procedimientos en España (cf. AHOEPM, patente 187.312, propiedad de *Merck & Co. Inc.*).

²⁶⁶ Las sales de base orgánica de penicilina, tales como la sal de trietil-amonio, la sal de N-etil-piperidina, la sal de ciclo-hexil-amina, la sal de N-etil-morfolina, la sal de N-metil-morfolina, la sal de N-etil-alfa-pipecolina, la sal de N-etil-hexahidro 2,6 lutidina, la sal de bencilamina o la sal de di-iso-propil-amina, pueden usarse como materiales de partida para este procedimiento.

²⁶⁷ Las sales alcalinas de una gran variedad de ácidos orgánicos, tales como fórmico, acético, propiónico, benzoico, oxálico, malónico, succínico y salicílico, pueden emplearse como sales reactivas, aunque el procedimiento no quede limitado a las sales de estos ácidos.

Los reactivos se han de disolver en disolventes orgánicos²⁶⁸ y, al entremezclarse en la masa de reacción, forman un medio que consiste en una sola fase líquida en la cual el producto final deseado de la reacción, la sal alcalina de penicilina, es esencialmente insoluble y los otros componentes del sistema de la reacción permanecen en solución.

Los autores señalan que han observado que los líquidos clorados que poseen dos átomos de cloro sustituyentes sobre el mismo átomo de carbono, son muy adecuados para ser usados como disolventes de las sales de base orgánica de penicilina y como constituyente líquido principal de la masa de reacción. La acción que presentan se cree que es debida a la unión por el hidrógeno entre el disolvente y la sal de base orgánica de penicilina, pero el procedimiento no se limita a esta teoría ni tampoco a tales líquidos clorados²⁶⁹.

La reacción de doble descomposición anteriormente mencionada puede realizarse en una amplia gama de temperatura, entre -10° C y + 40° C; pero hay ventajas de orden práctico al trabajar a temperaturas entre 15°-25° C ya que, a esas temperaturas, la sal de base orgánica y la sal alcalina reactiva son solubles en sus respectivos disolventes y, sin embargo, la penicilina alcalina producida no es excesivamente soluble en la mezcla de reacción.

La reacción de precipitación en la que se basa este método opera en una amplia escala de concentraciones de los reactivos, es decir de las sales de base orgánica de penicilina y sales alcalinas, en sus respectivos disolventes. La sal alcalina de penicilina puede prepararse en soluciones de sales de base orgánica de penicilina en acetona, a concentraciones tan bajas como 3 g. de sal de base orgánica de penicilina por litro de acetona. La reacción también se ha realizado con éxito, según se indica en la memoria, usando 400 g. de sal de base orgánica de penicilina por litro de cloroformo. Es preferible emplear una solución saturada de sal de base orgánica de penicilina en el disolvente de elección, reduciendo de esta manera al mínimo la pérdida del producto final deseado, debido a su solubilidad en los disolventes empleados.

Las concentraciones de 200-400 g. de sales de base orgánica de penicilina por litro de disolvente clorado han dado buenos resultados. La sal alcalina de penicilina deseada puede ser precipitada, incluso aunque las soluciones sean de concentraciones más bajas que la correspondiente a la saturación de la sal de base orgánica en el disolvente; análogamente, la solución de sal alcalina reactiva puede emplearse también

²⁶⁸ Los autores citan como ejemplos de disolventes adecuados para las sales de base orgánica de penicilina, en este procedimiento: líquidos orgánicos clorados, tales como bicloruro de metileno, CH_2Cl_2 , cloroformo, sim-tetra-cloroetano, denominado también 1,1-2,2-tetra-cloroetano, $\text{CHCl}_2\text{-CHCl}_2$ y cloruro de benzal, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CHCl}_2$; cetonas, tales como acetona, metil-etil-cetona, dietil-cetona y metil-propil-cetona y alcoholes alifáticos monovalentes inferiores, con 1 a 5 átomos de carbono, tales como metanol, etanol, 1-propanol, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$, isopropanol, $\text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_3$, n-butanol, alcohol butílico sec., $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CHOH-CH}_3$ y diversos alcoholes amílicos.

²⁶⁹ En el método de este procedimiento, los alcoholes alifáticos inferiores, con 1-8 átomos de carbono, tales como el metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, alcohol isobutílico, alcohol butílico sec., pentanol-1, pentanol-2, pentanol-3, 2-metil-butanol-3, 2,2-dimetil-propanol-1, 2-metil-butanol-4, 2-metil-butanol-1, hexanol-1, 2-etil-butanol, 2-etil-hexanol y glicol-etilénico son disolventes adecuados para los reactivos de sales alcalinas de los ácidos orgánicos. Aunque estos alcoholes se pueden utilizar sin la adición de agua, a veces se ha comprobado que es deseable o ventajoso añadir una pequeña cantidad de agua, hasta un 10% en volumen, incrementando con ello la solubilidad de la sal alcalina en el alcohol; además, esta pequeña adición del agua al alcohol ayuda a retener las impurezas coloreadas en las aguas madre de la masa de reacción, dando como resultado una sal alcalina de penicilina precipitada más blanca.

sobre una gama bastante grande de concentraciones. Normalmente se prefiere usar una solución saturada de la sal alcalina reactiva en el disolvente elegido, de modo que se mantenga bajo el volumen del reactivo y se reduzca al mínimo la pérdida del producto de reacción debida a su solubilidad en los líquidos empleados. En este procedimiento pueden usarse disolventes anhidros o disolventes que contengan hasta un 10% de agua en volumen.

Las soluciones de sal alcalina reactiva de concentraciones que varían desde 10 g. a 350 g. por litro de disolvente han mostrado su capacidad para dar resultados adecuados en este procedimiento. Algunas de las sales alcalinas de ácidos orgánicos que se usan como sales alcalinas reactivas poseen una solubilidad pequeña en los alcoholes anhidros, por lo que es ventajoso aumentar esta solubilidad por adición de un pequeño volumen de agua al alcohol empleado: pero esta adición de agua debe limitarse porque demasiada agua en la mezcla de reacción perturbará la precipitación de la sal alcalina de penicilina. Por lo tanto, es necesario ajustar el contenido de agua de modo que se obtengan los mejores resultados totales en el procedimiento.

Cuando se usa una solución de acetato potásico en n-butanol como sal alcalina reactiva, se comprueba que la solubilidad de esta sal en n-butanol anhidro es solamente de unos 30 g. por litro de solución. Si se añade al butanol un 2% en volumen de agua, la solubilidad del acetato aumenta aproximadamente a 104 g. por litro; esta cantidad de agua no es suficiente para perturbar la precipitación de la sal alcalina de penicilina. Si se añade más agua al n-butanol, por ejemplo tanto como 9% en volumen, la solubilidad de acetato potásico en la mezcla butanol-agua aumenta a unos 315 g. por litro. Aunque se obtiene un precipitado de la sal potásica de penicilina cuando se llevan a cabo reacciones con la última solución de reactivo, la eficacia no es tan grande como cuando se emplean reactivos con menor contenido de agua.

La sal de base orgánica de penicilina usada como material de partida para realizar este procedimiento no precisa poseer un determinado grado de pureza, los autores afirman que todos los preparados que han sido ensayados han dado resultados satisfactorios para las reacciones de este método. En la reacción que se describe se usan proporciones estequiométricas de los reactivos, aunque algunas veces es preferible usar un exceso moderado de un reactivo; los autores apuntan que puede llegarse a un 50%, de acuerdo con la práctica usual que se lleva a cabo en las reacciones en química orgánica.

Cuando la sal alcalina de penicilina precipitada se ha separado de la masa de reacción, es deseable lavar los cristales de la sal precipitada de manera que se eliminen los restos de soluciones de reacción adheridos. Se emplean como sustancias de lavado el n-butanol, mezcla disolvente empleada en la reacción o acetona, siempre usados en pequeña cantidad. Normalmente se lavan los cristales con n-butanol, que elimina el reactivo en exceso, en especial la sal alcalina reactiva que pudiera estar presente, luego se prefiere lavar con acetona, para separar el n-butanol y para acelerar el secado del producto final.

En resumen, este procedimiento, además de proporcionar un medio de obtener grandes rendimientos de sales de penicilina puras, terapéuticamente aceptables, a partir de preparados impuros, origina como resultado una precipitación preferente de sales alcalinas de bencil-penicilina desde la mezcla de reacción. La concentración de bencil-penicilina que puede obtenerse en el producto de penicilina alcalina depende del contenido de bencil-penicilina de las sales de base orgánica usada como material de partida. Sales de base orgánica que contienen desde 75%-85% de bencil-penicilina

originan, por este procedimiento, sales alcalinas de penicilina que contienen más de 90%-95% de bencil-penicilina, medida por métodos aceptados de análisis para este producto, tales como espectrofotometría ultravioleta o precipitación por N-etil-piperidina.

Este procedimiento posee la ventaja de enriquecer el contenido en bencil-penicilina del producto de penicilina alcalina por encima del material de partida, pero no queda restringido a la producción de bencil-penicilina, pues permite que penicilinas distintas de ella sean también purificadas y convertidas en sales alcalinas terapéuticamente valiosas. Los autores proponen unos ejemplos indicativos de la utilidad de este procedimiento²⁷⁰.

El 8 de abril de 1950 será, de nuevo, la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* quien presentará a registro un expediente para proteger “Un método para la producción de una sal de penicilina con efecto prolongado”²⁷¹. Los autores mantienen que es posible producir una sal de penicilina con una base orgánica cuya sal, al ser eyectada, origina en la sangre una concentración de penicilina más alta que el caso de penicilina procainica, teniendo al mismo tiempo un efecto más prolongado. Ésta es una sal de penicilina con un dialcohol-amino-alcohol-p-hidroxi-benzoato, en la cual los grupos alcoholilo son iguales o diferentes y tienen un número bajo de átomos de carbono, por ejemplo entre 1 y 3, como ocurre en p-hidroxi-benzoato. Estas sales son sólo ligeramente solubles en agua y en diversos disolventes orgánicos, por lo tanto pueden usarse satisfactoriamente para conseguir la concentración y purificación de la penicilina desde soluciones impuras.

Según este procedimiento, la penicilina o una sal de penicilina, se hace reaccionar con un dialcohol-amino-alcohol-p-hidroxi-benzoato o una sal del mismo, operando en condiciones tales que la sal de penicilina con dicha base precipite debido a su baja solubilidad. Este método es particularmente aplicable a la bencil-penicilina y la base usada es, preferentemente, dietil-amino-etil-hidroxi-benzoato, el grupo alcoholilo unido al anillo de carbono puede ser propilo o butilo.

En la práctica, una solución de una sal soluble de dialcohol-amino-alcohol-p-hidroxi-benzoato, en especial del dietil-amino-etil-p-hidroxi-benzoato, tal como el hidrocloruro o sulfato, se puede añadir a una solución acuosa, pura o impura, de una sal de penicilina, con lo cual la sal de penicilina, con la base dicha, precipita en forma cristalizada y se separa por filtración.

²⁷⁰ De la media docena de ejemplos que se incluyen en esta memoria, reseñamos el primero: un volumen de 8,5 l. de una solución acetónica amarillo pálida, que contiene 11.200 U.I. de penicilina trietil-amónica por mililitro (ca. 30% de bencil-penicilina), se mezcló, con agitación, a una temperatura de 20° C, con 313 ml. (exceso molar 50%) de una solución que contenía 75 g. de acetato potásico por litro en n-butanol, ajustando el contenido en agua aproximadamente a 1,5% en volumen. Al cabo de unos minutos se separaron cristales de penicilina potásica. Después de que la cristalización hubiera terminado, los cristales se separaron por filtración con succión, se lavaron con 200 ml. de acetona y se secaron al vacío. La penicilina potásica obtenida, ya seca, pesó 40 g., es decir, se obtuvo un rendimiento del 67% de la penicilina en la acetona. El producto era blanco, poseía una potencia de 1.570 U.I./ml. y su contenido en bencil-penicilina fue del 56%, según se determinó por el método espectrofotométrico ultravioleta.

²⁷¹ AHOEPM, patente 192.462. La memoria descriptiva consta de ocho hojas, escritas por una sola cara, firmadas en Madrid a 8 de abril de 1950; esta solicitud se corresponde con la presentada en Dinamarca el 9-IV-1949, bajo el número 1.240/49. La empresa se encontraba establecida en el 19 Bonshøjvej, Copenhague (Dinamarca). La patente española fue concedida el 27-II-1951 y publicada el 1-IV-1951.

La sal de bencil-penicilina con dietil-aminoetil-p-hidroxi-benzoato obtenida es un producto cristalino estable que, en disoluciones acuosas, cristaliza con una molécula de agua; su punto de fusión es de 80°-90 ° C; su potencia es de 1.000 U.I./mg., referida a una potencia de 1.667 U.I./mg. de la sal sódica pura de bencil-penicilina; y su solubilidad en agua, a 25 ° C, es de 14,5 partes en peso por 100 partes en peso de agua²⁷².

El 28 de marzo de 1953 un danés, Rudolf Carl Reiter, presentó ante el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, “Un procedimiento para producir sales de penicilina partiendo de sales impuras de penicilina con aminas”²⁷³. El método señalado por este autor consta de las siguientes operaciones químicas:

- a) Disolver, o en su defecto suspender, una sal impura de penicilina con una amina en un alcohol²⁷⁴.
- b) Añadir a la solución así obtenida una sal de una N-substituida alquilenodiamina, en tal proporción que se precipite un dipenicilinato de dicha diamina²⁷⁵.
- c) Separar la sal así obtenida de esta solución.

Las sales de diaminas de penicilina que se obtienen por este procedimiento, después de su lavado y secado, son suficientemente puras para usos médicos. La mayoría de estas sales de penicilina, por ejemplo el dipenicilinato de N,N'-dibencil-etileno-diamina, son muy poco solubles en agua y debido a ello, en comparación con las sales metálicas alcalinas de penicilina, tienen un efecto prolongado en sus usos terapéuticos. Estas sales purificadas de penicilina pueden convertirse en sales potásicas de penicilina y, a partir de ellas, prepararse otras sales de penicilina de uso general. El autor propone unos ejemplos aclarativos de este procedimiento²⁷⁶.

²⁷² Los autores ilustran su procedimiento con cuatro ejemplos bastante similares; comentamos el primero de ellos: una solución formada por 7,5 g. de sal sódica de penicilina, de potencia 1.660 U.I./mg., disuelta en 175 ml. de agua, a una temperatura de 5° C, se mezcla con otra solución formada por 6 g. de hidrocloreto de dietil-amino-etil-p-hidroxi-benzoato disueltos en 60 ml. de agua. La sal cristaliza en agujas finas; se deja reposar la mezcla durante dos horas. Al cabo de ese tiempo, los cristales precipitados se filtran de la solución y se lavan dos veces con 25 ml. de agua. La sal se seca en un desecador sobre ácido sulfúrico. El rendimiento es de 10 g. de la sal de penicilina con dietil-amino-etil-p-hidroxi-benzoato, con una potencia de 1.000 U.I./mg.

²⁷³ AHOEPM, patente 208.539; la memoria descriptiva consta de siete hojas escritas a máquina por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 28-III-1953, por Rudolf Carl Reiter, representado por Francisco García Cabrerizo. Rudolf Carl Reiter figura como residente en Copenhague (Dinamarca) en el número 14 de Gaaseholmvej, Herlev. La patente española, de invención, fue concedida el 22-IV-1954 y publicada el 1-VI-1954.

²⁷⁴ Como sales de amina de penicilina se pueden utilizar las sales de penicilina, por ejemplo trietil-amina, N-etil-pepíridina, ciclo-hexil-amina, N-etil-morfolina, procaína o N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil).

²⁷⁵ Entre las sales N-sustituídas de las alqueno-diaminas que pueden utilizarse para la precipitación se citan las sales de las etileno-diaminas N-disustituídas, pero las sales de penicilina son muy poco solubles en los alcoholes que se emplean en el procedimiento.

²⁷⁶ De los tres ejemplos que se incluyen en la memoria descriptiva comentamos el primero de ellos: como reactivo inicial se emplea la sal cruda de penicilina y procaína, obtenida por precipitación de un extracto de acetato de butilo del caldo de penicilina con procaína; esta sal impura tiene color amarillo y posee una potencia de 950 U.I./mg. Se partió de 63,8 g. del producto indicado, que se disolvieron en 280 cm³ de metanol (alcohol metílico). Se filtraron a través de un filtro que no deja pasar bacterias. A la solución filtrada se le añadió una solución de 20,2 g. del di-acetato de N,N'-dibencil-etilén-diamina

El 5 de diciembre de 1956 es una empresa noruega, A/S *Apothekernes Laboratorium for special-preparater*, quien presenta ante el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a un “Procedimiento para la obtención de ácidos penicilínicos libres”²⁷⁷; se trata de un proceso de depuración especial obteniéndose, con rendimiento prácticamente cuantitativo, soluciones muy puras de ácidos penicilínicos libres en disolventes orgánicos. Estos ácidos son aislados a partir de sus soluciones, o pueden ser convertidos en sales, según las técnicas ya conocidas.

El procedimiento se caracteriza por el hecho de que los productos anhidros de partida se tratan con un disolvente orgánico en el cual está disuelto o suspendido un ácido anhidro o casi anhidro, orgánico o inorgánico, obteniéndose así en el disolvente orgánico una solución de ácidos penicilínicos libres, a partir de la cual se separan dichos ácidos penicilínicos o sus sales. Las posibles impurezas presentes, en particular las coloreadas, permanecen insolubles y pueden ser separadas por filtración, centrifugación u otros métodos, quedando así los ácidos penicilínicos libres.

Los autores señalan que el procedimiento es tan efectivo que los ácidos penicilínicos libres obtenidos en el disolvente orgánico pueden ser aislados sin más depuración ulterior, directamente en estado incoloro y analíticamente puro²⁷⁸.

2.2.3.e. Disolventes de las sales envasadas

El 21 de enero de 1949 fue la empresa francesa *Société des Usines Chimiques Rhone Poulenc* quien presenta a registro un expediente para proteger su invención relativa a un “Procedimiento para la obtención de penicilina estable”²⁷⁹. Los autores

mezclado con 280 cm³ de etanol y 55 cm³ de agua, solución que también conviene filtrar con un filtro que retenga las bacterias. Esta nueva mezcla se deja reposar, durante dos horas, a 0° C; a continuación, el dipenicilinato de N,N'-dibencil-etilén-diamina se filtra bajo condiciones asépticas y se lava encima del filtro con etanol y, luego, con agua. Se seca y el peso de la sal obtenida será de 43,2 g.; el producto tiene una potencia de 1.200 U.I./mg.

²⁷⁷ AHOEPM, patente 232.307; la memoria descriptiva consta de once hojas, escritas por una sola cara, fechadas en Madrid, a 5 de diciembre de 1956; el expediente se corresponde con el presentado en Noruega, el 14 de diciembre de 1955, bajo el número 119.220/55. La empresa se encontraba establecida en Harbitz Allé 3, Skøyen (Oslo, Noruega). La patente española fue concedida el 3-III-1957 y hecha pública el 16-VI-1957.

²⁷⁸ Los autores proponen siete casos prácticos, aclarativos de su invento, realizados con distintos tipos de penicilinas; reseñamos el primero de ellos: a una solución de 23 g. de ácido tartárico en 50 cm³ de butanol sec., se añaden 7,5 g. de un producto impurificado: anhídrido de bencil-penicilina potásica, el cual contiene 1.532 U.I.; se formó una solución de ácido bencil-penicilínico libre en butanol sec., el bitartrato potásico fue precipitado cuantitativamente y separado por filtración. El precipitado obtenido se lavó con 20 cm³ de butanol sec.; el precipitado se secó y pesó 3,7 g.; este filtrado limpio fue agregado a una solución de 1,8 g. de acetato sódico anhidro en 12 cm³ de metanol, con lo cual precipitó bencil-penicilina sódica en finos cristales blancos; estos cristales se reunieron en un filtro, se lavaron con butanol sec. y se secaron; la cantidad de bencil-penicilina sódica que se obtuvo fue de 6,5 g., poseía una actividad de 1.650 U.I. El rendimiento asciende al 95% del valor teórico con una actividad de un 100%.

²⁷⁹ AHOEPM, 186.709; la memoria descriptiva consta de seis hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid a 21 de enero de 1949. La empresa figura domiciliada en *rue Jean Goujon*, Paris (Francia). El expediente se corresponde con el presentado ante la Administración francesa con fecha de 13 de mayo de 1948, registro 554.908. La patente española le fue concedida el 28-I-1949 y publicada el 16-III-1949.

mantienen que, si en lugar de disolver la penicilina en agua pura, se realiza la disolución en una solución tamponada a un pH comprendido entre 6,5 y 8,5, las soluciones de penicilina son estables durante varios días entre los límites normales de su empleo, o sea que, conservada la solución durante cuatro días a 25° C, no pierde su eficacia, por lo que no necesita de refrigeración durante el período de utilización clínica²⁸⁰; las sales que se usan preferentemente para preparar las soluciones tampones son los citratos o las mezclas de fosfatos alcalinos²⁸¹.

El procedimiento propuesto consiste en evaporar una solución de sales-tampones en los recipientes que contendrán la penicilina, esterilizar en seco estos recipientes e introducir en ellos la penicilina sólida. Para realizar una esterilización de los frascos o recipientes destinados a contener la penicilina es preciso someterlos, durante una hora, a temperatura de 250° C; operando a esta temperatura de esterilización no se pueden emplear ciertas sales-tampón, como los citratos alcalinos, que se descomponen a esta temperatura tomando un color amarillento. Los solicitantes proponen, como sales-tampones, fosfatos o pirofosfatos alcalinos²⁸² que, después de una hora de calentamiento a 250° C, originen una solución acuosa de pH comprendido entre 7,0 y 9,0, preferentemente 8,0²⁸³.

2.2.3.f. Preparaciones extemporáneas

A finales de la década de 1940 el producto penicilina-procaína en suspensión acuosa era ya una realidad, al menos en Estados Unidos y buena parte de los países europeos; se comercializaba en ampollas que contenían la sal de procaína desecada incorporada a un coloide hidrófilo para mantener la suspensión cuando se le añadiera agua o una solución salina. Esta preparación era un medio muy aceptable para la

²⁸⁰ Los autores indican que en un volumen de 10-20 cm³ se puede disolver una cantidad de penicilina que tenga una potencia de 100.00-500.000 U.O.

²⁸¹ Utilizan, para sostener ese argumento, las referencias de Robert J.V. PULVERTAFT, John YUDKIN. "Stabilisation of penicillin solutions with phosphate". *The Lancet*, 248(6417): 265-267. Londres, 1946; Robertson PRATT. "Stabilization of penicillin in aqueous solutions by low concentrations of phosphates". *Nature*, 159(4033): 233. Londres, 1947; Robertson PRATT. "Influence of phosphate on stability of partially purified penicillins". *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 36(3): 69-72. Washington DC, 1947; y L. HAHN. "Stabilization of penicillin-salt solutions with sodium citrate". *Nature*, 160(4071): 639. Londres, 1947.

²⁸² En opinión de los autores, las mezclas más convenientes son, en el caso de usar fosfatos mono- y di-sódicos, aquellas que contienen entre 10% y 50% de fosfato mono-sódico; si se usasen pirofosfatos neutros y sal sódica ácida, es conveniente que la cantidad de pirofosfato ácido esté comprendida entre 5%-40%; el mismo porcentaje se ha de usar de sales cristalinas hidratadas. La cantidad de sales anhidras, de la mezcla de fosfatos y pirofosfatos sólidos que se han de disolver con la penicilina, está comprendida entre 1%-10% del peso de la penicilina que se ha de estabilizar, el empleo de cantidades superiores es reportado por inútil.

²⁸³ Los autores incluyen, en el texto de la memoria descriptiva, un par de ejemplos; reseñamos el primero de ellos: una solución de 6,9 g. de P₄O₂Na₂H (1 aq.), 17,9 g. de P₂O₄NaH (12 aq.) y agua (q.s.) se introduce en un recipiente de 20 cm³ del modelo generalmente empleado para la penicilina; el recipiente ha de ser calentado, durante una hora, a 250° C; después se procede a llenarlo, con las precauciones de esterilización conocidas. Cada recipiente recibe una cantidad de penicilina G del orden de 200.000 U.O., es decir unos 120 mg.; el contenido del recipiente se disuelve en agua destilada esterilizada, por ejemplo 20 cm³, o en suero glucosado o salado ordinario. La solución obtenida se puede conservar sin precaución especial, a la temperatura ambiente, en el cuarto del paciente; los datos de efectividad, tras cuatro días a 25° C, muestran una pérdida de 79% en los casos en que no se han introducido fosfatos y un 3,6% donde los fosfatos han sido introducidos.

aplicación de la penicilina, pero su precio, en plena autarquía, hace que fuera inaccesible al público en el mercado español. En esos momentos en España solamente se importaba la penicilina en forma de sal sódica amorfa o penicilina G cristalizada, por lo tanto, no se podía disponer de este nuevo procedimiento de medicación.

Para solventar este problema, de índole estrictamente nacional, algunos laboratorios españoles -y un médico barcelonés, Enrique Bassas Grau²⁸⁴-, idean algunas soluciones para transformar la penicilina sódica comercial en una sal insoluble cristalina, de modo que el proceso de cristalización ocurra fuera del frasco de penicilina, con lo que se evitaba la obstrucción de las agujas y se facilitaba el deslizamiento del émbolo en el momento de la inyección.

El 5 de febrero de 1949, el médico barcelonés Enrique Bassas Grau presentó ante el registro de patentes un expediente para proteger, por veinte años, un proceso de su invención relativo a “Un procedimiento para la preparación de suspensiones acuosas de penicilina”²⁸⁵; la novedad que propone este médico es la introducción de la sal de penicilina en suspensión acuosa; la ventaja de este procedimiento es que, como no contiene aceite, se evitan los perjuicios derivados de este vehículo.

La preparación de esta sal de penicilina en suspensión acuosas, a partir de la penicilina sódica comercial que en aquel entonces se comercializaba en España, puede lograr -en opinión de su autor- los mismos efectos terapéuticos que los inaccesibles preparados extranjeros, a la par que eliminaría los cristales mantenidos en suspensión en las preparaciones comerciales, pues la cristalización tiene lugar en el interior del organismo, una vez eyectada la preparación, lo que supone una notable mejora sobre los preparados extranjeros.

El procedimiento presentado por Enrique Bassas abarca tres fases preparatorias:

- a) Transformación de la penicilina sódica comercial en sal cristalina insoluble.
- b) Cristalización fuera del frasco de penicilina, en el interior del organismo.
- c) Evitar la formación de cristales de gran tamaño dentro de la jeringa de inyección.

²⁸⁴ Enrique Bassas Grau (Barcelona, 1917 / Barcelona, 1979) estudió Medicina en la Universidad de Barcelona y perfeccionó sus estudios en París; profesor ayudante de Dermatología en la Universidad de Barcelona, fue miembro de la Real Academia de Medicina de Barcelona. Colaborador habitual de *Summa Medica*, *Revista de Información Médico-Terapéutica* y *Münchener Medizinische Wochenschrift*, fue autor de tratados clásicos de Dermatología: *Tratamiento interno de la Dermatozois* (Barcelona, 1948) y *Terapéutica antihistamínica en Dermatología* (Barcelona, 1952), entre otros (cf. Josep M. CALBET y Jacint CORBELLÀ. *Diccionario biogràfic de metges catalans*. Barcelona: Rafael Dalmau, 1981-1983. 3 vols., vol. 1: 70). Este autor había presentado a registro otras patentes con la que ésta guarda cierta similitud: “Un procedimiento, con su correspondiente depósito, para llenado de ampollas que contienen sustancia sólida para su disolución...” (AHOEPM, patente 171.970. 27-XII-1945); “Un procedimiento para la obtención y preparación de derivados del ácido para-amino-salicílico y sus asociaciones con derivados de la tiosemicarbazona” (AHOEPM, patente 197.538. 26-XII-1950), se ocupará, también, de registrar nuevos procedimientos para confeccionar tiras elásticas, apósitos medicinales, abrasivos para usos médicos, obturadoras para envases flexibles, aparatos manuales para la eliminación de cutículas, sistemas para el tratamiento del cabello, frotadoras electrificantes, nebulizadores para uso farmacéutico o nuevos modos de elaborar comprimidos; sobre él volveremos más adelante.

²⁸⁵ AHOEPM, patente 186.907; la memoria descriptiva consta de nueve hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid a 5 de febrero de 1949; como domicilio de Enrique Bassas figura el número 12 del Paseo de Gracia, en Barcelona. La patente fue concedida el 7-II-1949 y hecha pública el 16-III-1949.

Para realizar la primera fase parte de una ampolla de capacidad 1 cm³, con agua bidestilada con 0,10 g. de citrato sódico como agente estabilizador; el contenido de esta ampolla se utiliza para aspirar en él la penicilina disuelta; la ampolla usada corresponde a la dosificación para cada fracción de 200.000 U.O. de penicilina. Otra ampolla de 1 cm³ contiene la solución cristalizante que se ha preparado con 0,14 g. de clorhidrato de para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol y 0,05 g. de gelatina, todo ello disuelto en agua destilada hasta completar el volumen de 1 cm³.

Una vez incorporada la penicilina a la primera ampolla se aspira con una jeringa y, a continuación, se absorbe el contenido de la segunda ampolla, con lo cual, en opinión del autor, se logra:

1. La transformación de la penicilina sódica comercial en sal insoluble cristalizada (clorhidrato de para-benzoil-dietil-amino-etanol o clorhidrato de quinina).
2. Iniciar esta cristalización en el interior de la jeringa, en el preciso momento de ser administrada, mediante un vehículo solubilizante (solución de citrato sódico) y otro cristalizante, para mezclar en el interior de la jeringa.
3. Evitar la formación de cristales de gran tamaño, mediante la adición de gelatina, y retardar la cristalización mediante la adición de glicerina, de forma que ésta tenga lugar, precisamente, en el organismo una vez inyectada.

De manera práctica, 100.000 unidades de penicilina comercial se disuelven en una solución acuosa formada por 0,7 g. de clorhidrato de para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol, en 1 cm³ de agua destilada. Antes de realizar la mezcla indicada se ha de disolver previamente la penicilina en una jeringa que contenga ½ cm³ de agua destilada por cada 100.000 U.I. de penicilina o fracción, aspirando la penicilina dentro de la jeringa; cuando ya se ha introducido la penicilina dentro de la jeringa, se aspira una solución de 0,025 g. de citrato sódico y 0,035 g. de cloruro de para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol en ½ cm³ de agua destilada.

Para lograr la formación de pequeños cristales, en los casos descritos, el autor incorpora a la mezcla un 5% de gelatina, plasma o pirrolidona polivinílica, con lo cual el tamaño de los cristales es mínimo. En el interior de la jeringa, una vez mezcladas la solución acuosa de penicilina y la solución cristalizante, se puede retrasar la cristalización mediante adición de un 5% de glicerina; entonces la cristalización tendrá lugar dentro del organismo inyectado.

El 31 de mayo de 1949 es otra empresa española, *Laboratorios Vigoncal S.A.* quien presenta ante el registro de patentes una solicitud para proteger, por veinte años, una invención relativa a “Un procedimiento químico industrializable, para obtener una suspensión acuosa de penicilina insoluble”²⁸⁶. Los autores mantienen que cualquier penicilina G del comercio, soluble y de absorción y eliminación rápida, es transformable, de manera inmediata, por la acción de una solución acuosa de clorhidrato de para-amino-benzol-dietil-amino-metanol, en una suspensión acuosa de penicilina insoluble, que se absorbe y se elimina lentamente, prolongando así su tiempo de acción terapéutica útil; el producto ha de ser inyectado en el momento mismo en que se prepara.

²⁸⁶ AHOEPM, patente 188.443; la memoria descriptiva queda firmada, en Madrid, a 31 de mayo de 1949. La empresa figura como domiciliada en Madrid, en el número 34 de la calle Ferrer del Río. La patente fue concedida el 1-IX-1949 y publicada el 1-XII-1949.

Mediante este método se logra la transformación de cualquier penicilina G soluble en agua en penicilinato de procaína (penicilina + procaína), insoluble en suspensión acuosa microcristalina, que se libera de forma lenta y progresiva en los tejidos, proporcionando así en la sangre un nivel penicilínico durante un tiempo mucho más largo que cuando es soluble en agua el producto que se inyecta. Con él se eliminan los peligros que producen los vehículos oleosos y céreos insolubles que se encuentran en el mercado, evitando que la penicilina se altere por el líquido en el transcurso del tiempo y por la acción de la temperatura durante su almacenamiento²⁸⁷.

El 16 de julio de 1949 la empresa española EFEYN S.A. presentó a registro su solicitud de protección, por veinte años, para “Un procedimiento para la preparación de un vehículo para conseguir la acción sostenida de la penicilina”²⁸⁸. Los investigadores de esta empresa idearon el procedimiento de transformar, a voluntad, la penicilina sódica, de fácil adquisición en el comercio, en penicilina-procaína, por medio de la procaína, que es un vehículo que, al disolver las penicilina sódica, la transforma en procaína-penicilina.

El método operativo que proponen estos autores es el siguiente: se comienza preparando una solución al 2% de procaína en agua bidestilada, éste agua ha sido sometida previamente a ebullición durante dos horas con un 5% de carbón activo y filtrada posteriormente a través de placas de asbestos. Esta solución se mantiene en frascos herméticamente cerrados, a la temperatura de 0° C, durante 24 horas. Pasado ese tiempo se lleva al autoclave, donde se mantendrá unas horas, durante tres días consecutivos, a las temperaturas sucesivas de 90°, 80° y 75° C. La solución obtenida se envasa en ampollas de 5 cm³, que se esterilizan a la temperatura de 115° C, durante un tiempo de 20 minutos. Cuando la solución ya está envasada y esterilizada, se debe someter a pruebas, por procedimientos biológicos, para determinar la ausencia de pirógenos. Con la solución de clorhidrato de procaína al 2% en ampollas de 5 cc. se consigue un vehículo que disuelve la penicilina sódica y, en parte, la transforma en procaína-penicilina.

Según estos autores, al emplear 2 cc. de clorhidrato de procaína para disolver las 100.000 U.I. de penicilina se consigue, por una parte, una solución de penicilina que es fácilmente difundida y que penetra rápidamente en todos los tejidos, por lo que se logra una primera absorción rápida y, por otra, forma una suspensión de procaína-penicilina que es menos soluble y, por tanto, de acción lenta. Por este motivo los autores denominan a este proceso de semi-suspensión, por ofrecer esa doble ventaja del efecto

²⁸⁷ Los autores señalan un procedimiento de actuación: se toman 300.000 unidades de penicilina G; se les añaden 3 cc. de solución acuosa de clorhidrato de para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol (procaína), en proporción equimolecular [*sic*] con la penicilina, agitándose nuevamente para realizar una mezcla rápida y se deja reaccionar de 5 a 10 minutos, hasta que aparezca un precipitado cristalino, entonces se vuelve a agitar para homogeneizar la suspensión. A partir de este tipo mínimo de suspensión, para inyecciones cada 24 horas, con 300.000 U.I., se pueden preparar suspensiones con solución acuosa de clorhidrato de para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol con solución acuosa de penicilina G, de mayor concentración y con mayor número de horas de efecto prolongado, aumentando por cada 50.000 U.I. más de penicilina G la cantidad de medio centímetro de solución acuosa equimolecular [*sic*] de clorhidrato de para-amino-benzoil-dietil-aminoetanol (procaína).

²⁸⁸ AHOEPM, patente 189.110; la memoria descriptiva consta de siete hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, queda fechada en Madrid, a 16 de julio de 1949. La entidad señala como domicilio social el número 81 de la madrileña calle de Bravo Murillo. La patente fue concedida el 19-VII-1949 y hecha pública el 1-X-1949.

rápido y del efecto sostenido, que constituyen el ideal en el empleo terapéutico de la penicilina.

La forma práctica de operar se describe así en la memoria: se toman 2 cc. de clorhidrato de procaína; se introducen en el interior del envase original de penicilina sódica, en el cual previamente se ha limpiado el tapón de caucho con alcohol, y se agita para conseguir la disolución completa de la penicilina. Inmediatamente se recoge con la jeringa y se inyecta la solución que se ha formado; con ello se obtiene una difusión rápida de la penicilina completamente disuelta y otra, de un efecto lento, con los cristales de procaína-penicilina que se forman dentro de los tejidos y, como ésta tiene escasa solubilidad, hace que se mantengan los niveles adecuados de penicilina durante 24 horas.

Si se emplean 200.000 U.I. de penicilina, se sigue el mismo proceder, siendo conveniente en este caso disolverla con 4 cc. de solución de clorhidrato de procaína, formándose también una semi-suspensión, pues una parte queda disuelta y la otra es la que se transforma en procaína; los autores aclaran que la concentración al 2% ha sido elegida por ellos para que solamente se transforme una parte de la penicilina en procaína-penicilina y, por lo tanto, obtener una mayor eficacia terapéutica.

Al eliminar la cera, además de obtener una preparación más fluida a la temperatura ambiente y facilitar el llenado de la jeringa y el que la inyección sea más fácil realizar, se reducen las molestias locales, como son el dolor, las induraciones y abscesos que se presentan con la ‘fórmula Romansky y Rittmann’, de suspensión en aceite y cera, al parecer ya en desuso cuando los autores redactan su memoria [1949].

Apenas unos días después, el 27 de julio de 1949, esta misma empresa española, EFEYN S.A., presentará en registro una nueva solicitud de patente, ésta por “Un procedimiento para la preparación de un vehículo hidro-oleoso, para conseguir la acción sostenida de la penicilina”²⁸⁹. En términos prácticamente idénticos a los de la memoria presentada diez días atrás (AHOEPM, patente 189.110), los autores señalan los trabajos realizados para conseguir procaína-penicilina; sobre la que aportan ahora una nueva forma de prepararla: se disuelve, en aceite de cacahuete, monoestearato de albúmina en la proporción del 2%, procediendo a la filtración en caliente y a presión a través de asbestos, la solución que se obtiene se envasa en ampollas de 2 cc. que se esteriliza a 115° C durante 20 minutos. Al mismo tiempo se realiza una solución de clorhidrato de procaína, también en la proporción del 2% en agua bidestilada; el agua se ha de someter previamente a ebullición durante dos horas, en presencia de un 5% de carbón activo, y filtrado posteriormente a través de placas de asbestos. La solución es mantenida en frascos herméticamente cerrados, a la temperatura de 0° C, durante 24 horas; a continuación se lleva al autoclave, manteniéndola tres días sucesivos, durante una hora, a las temperaturas sucesivas de 90°, 80° y 75° C. La solución se envasa en ampollas de 2 cc. que se esterilizan definitivamente en el autoclave, a la temperatura de 115° C, durante 20 minutos. Es necesario que, una vez que la solución este envasada y esterilizada, se someta a unas pruebas por procedimientos biológicos para demostrar la ausencia de pirógenos.

²⁸⁹ AHOEPM, patente 189.110; la memoria descriptiva consta de cinco hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, queda fechada en Madrid, a 27 de julio de 1949. La entidad mantiene su domicilio social en el número 81 de la calle de Bravo Murillo, en Madrid. La patente fue concedida el 28-VII-1949 y hecha pública el 1-X-1949.

La solución de clorhidrato de cocaína al 2% es el vehículo que, a la vez que disuelve la penicilina sódica, la transforma en penicilina-procaína. La solución al 2% de monoestearato de albúmina en aceite de cacahuete, que aporta a la solución de procaína-penicilina el elemento oleoso, se dispensará en la solución acuosa, formando una emulsión estable. La emulsión aceite/agua formada con las soluciones anteriores tiene la propiedad de retardar la reabsorción de penicilina, manteniendo una concentración útil en sangre durante un tiempo no inferior a 96 horas.

Para el uso de esta preparación, se toman 2 cc. de la solución de clorhidrato de procaína en agua, que se introduce con una jeringa y agua en el frasco original de penicilina; se agita hasta conseguir la solución de la penicilina sódica. La ampolla que contiene la solución oleosa se agita previamente, introduciendo por el mismo procedimiento esta solución oleosa en el frasco original de penicilina, agitando fuertemente para formar una emulsión; una vez formada se procede rápidamente a su inyección.

Esta suspensión procaína-penicilina-aceite es de fácil administración y, según los autores, tiene las siguientes ventajas:

- Produce altos y prolongados niveles de penicilina en sangre, conservándose dentro de los niveles eficaces durante 96 horas.
- No es dolorosa.
- No causa induraciones ni abscesos, por haberse prescindido de la cera.
- No obstruye la jeringa ni la aguja, siendo fácil de aspirar y medir con exactitud.
- La ampolla oleosa permanece siempre líquida y no necesita calentarse.

El 4 de mayo de 1955, una empresa milanesa, *Farmaceutici Italia S.A.*, solicitó ante el registro español de patentes la protección de su “Procedimiento para la obtención de un vehículo reactivo para la preparación extemporánea de suspensiones de penicilina que presentan una actividad inmediata y persistente o solo persistente”²⁹⁰. El producto objeto de esta invención es una solución acuosa de una sal de N,N'-dibencil-etilén-diamina a la que se le añade un agente de alcalinización y otro agente tensoactivo en tal proporción que se puede obtener, cuando dicha solución es adicionada a una determinada cantidad de penicilina, un pH óptimo desde los diferentes puntos de vista que interesan: tolerancia fisiológica, estabilidad de la solución, posibilidad de introducirse en una jeringa (debido a la forma y dimensiones de los cristales) y tiene una repartición deseada, entre la porción de acción inmediata y la de acción persistente, del efecto terapéutico.

La salificación se puede realizar con aquellos ácidos que originen sales solubles con N,N'-dibencil-etilén-diamina y sean tolerados fisiológicamente; particularmente son útiles los aminoácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos (por ejemplo ácido glutámico), los ácidos alifáticos (ácido acético, ácido cítrico), el ácido carbónico, los ácidos minerales (como el clorhídrico) o mezclas de ellos. Como agente de alcalinización se puede emplear N,N'-dibencil-etilén-diamina o cualquier base que no produzca incompatibilidad fisiológica o química con los demás ingredientes del producto. Los resultados óptimos se obtienen cuando se usa un exceso de la base y no

²⁹⁰ AHOEPM, patente 221.679; la memoria descriptiva consta de 10 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara, queda firmada en Madrid, el 4 de mayo de 1955. La empresa figura como domiciliada en Milan, vía F. Turati, 18 (Italia). El procedimiento tiene prioridad italiana nº 6198/54 del 5 de mayo de 1954. La patente española fue concedida el 4-V-1955 y publicada el 1-XII-1955.

cuando se emplean cantidades estequiométricas de los diferentes compuestos necesarios, como se había pensado en un principio. Para obtener suspensiones muy concentradas y fácilmente inyectables se debe añadir a la solución un agente tensoactivo como pectina, 'Tween' (por ejemplo 'Tween 80'), carboxi-metil-celulosa, metil-celulosa o mezcla de éstos²⁹¹.

Muy similar al anterior es el expediente que esta misma empresa italiana, *Farmaceutici Italia S.A.*, presentó apenas unos días después, el 7 de mayo de 1955, para proteger su "Procedimiento para la obtención extemporánea de suspensiones de penicilina que presentan acción inmediata, retardada y persistente"²⁹²; realmente, como reconocen los propios autores, se trata de una ampliación de la patente española 221.679. El producto que forma el objeto de esta patente es una mezcla de una solución acuosa de una sal de N,N'-dibencil-etilén-diamina y de una solución de una sal del para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol, con una adición eventual de un agente de alcalinización y de un agente tensoactivo. Para el proceso de salificación pueden emplearse todos los ácidos que producen sales solubles, ya sea con N,N'-dibencil-etilén-diamina, ya sea con para-amino-benzoil-dietilamino-etanol, siempre que sean tolerados desde el punto de vista fisiológico. Como agentes de alcalinización se emplea N,N'-dibencil-etilén-diamina, la base de para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol o cualquier otra que no produzca incompatibilidad fisiológica o química con los demás ingredientes del producto. El óptimo de los resultados es obtenido con un exceso de base con relación al ácido salificador; cuando de los ácidos salificadores de las dos bases uno es un inorgánico, particularmente el ácido clorhídrico, se obtienen suspensiones que pueden ser jeringadas mejor aún. Para obtener buenos resultados de inyectabilidad, para las soluciones muy concentradas, se debe añadir a la solución un tensoactivo, como por ejemplo pectina, 'Tween', carboxi-metil-celulosa y sus mezclas²⁹³.

²⁹¹ Los autores ilustran su procedimiento con unos once ejemplos, nos ocupamos aquí, como modelo, del primero de ellos: se disuelven 4.389 g. de glutamato de N,N'-dibencil-etilén-diamina en 100 cm³ de agua para inyección; esta solución se lleva a pH 5.85 adicionando 0,194 g. de N,N'-dibencil-etilén-diamina; luego se le adicionan 2 g. de 'Twen 80'. La solución se filtra mediante una bujía esterilizadora y se reparte asépticamente; unos 6 cm³ de esta solución, cuando se añaden a 600.000 U.I. de penicilina G sódica, dan un producto inyectable que contiene en suspensión 600.000 U.I. de penicilina de acción persistente. Otros 6 cm³ de la solución indicada, adicionados a 100.000 U.I. de penicilina soluble en agua, dan una solución de 40.000 U.I. de penicilina de acción inmediata, que contiene en suspensión 60.000 U.I. de penicilina de acción persistente.

²⁹² AHOEPM, patente 221.746; la memoria descriptiva consta de 14 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara, queda firmada en "Barcelona, para Madrid", a 7 de mayo de 1955. La empresa figura como domiciliada en la vía Turati, 18, Milan (Italia). El procedimiento tiene prioridad italiana 6267/54 de 8 de mayo de 1954. La patente española fue concedida el 18-X-1955 y hecha pública el 1-XII-1955.

²⁹³ El autor propone más de una quincena de ejemplos ilustrativos de su invento; a título indicativo reseñamos el primero de ellos: en 70 cm³ de agua para inyecciones se disuelven 1,954 g. de clorhidrato de N,N'-dibencil-etilén-diamina y 2,4 g. de clorhidrato de para-amino-benzoil-dietil-amino-etanol; a esta mezcla se le adiciona 0,667 g. de N,N'-dibencil-etilén-diamina y 2 g. de 'Tween 80'; la solución obtenida se completa en su volumen a 100 cm³ con agua para inyecciones; su pH es de 6,45. La solución se esteriliza; se toman 6 cm³ de esta solución y se adicionan a 1.200.000 U.I. de cualquier penicilina soluble en agua. Se obtiene así un producto inyectable que contiene en suspensión 600.000 U.I. de penicilina de acción persistente y 300.000 U.I. de penicilina retardada, quedando el resto de la penicilina en la solución.

2.2.3.g. Preparaciones extemporáneas con quinina

El 30 de marzo de 1950 es una empresa francesa, *Les Laboratoires Français de Chimotherapie*, quien presenta ante el registro de patentes español una solicitud para proteger, por veinte años, una invención relativa a “Un procedimiento de preparación de soluciones de penicilina de efecto prolongado”²⁹⁴; se trata de la combinación de penicilina con quinina y otros alcaloides. Los productos formados resultan ser poco solubles o insolubles en agua o en suero sanguíneo y pueden ser inyectados en forma de suspensión oleosa, solución en un disolvente orgánico o en suspensión en agua, ejerciendo así en el organismo la acción antibacteriana de la penicilina con un efecto considerablemente prolongado. Según los autores, estas preparaciones ofrecen grandes ventajas sobre la entonces determinadas ‘penicilinas retardadas’.

Los autores de esta memoria mantienen que se puede provocar la formación de los compuestos de penicilina en el mismo organismo, o sea *in vivo*, al inyectar una solución que es preparada en el momento, disolviendo penicilina en polvo microcristalino (que puede ser en forma de su sal sódica o potásica), en un disolvente adecuado tal como el propileno-glicol, que debe contener en solución una sal básica de quinina, como podía ser el formiato o una sal de una base afin a la quinina. Gracias al disolvente empleado, con preferencia el propileno-glicol en presencia de un poco de agua y en condiciones estrictas de dilución, no se forman cristales en el momento de poner en solución la penicilina, lo cual es rápido, por lo que es posible inyectar una solución perfectamente límpida.

La solución de la sal de penicilina en propileno-glicol no cristaliza inmediatamente *in vitro*; solamente *in vivo*, en contacto con los líquidos del organismo, al cristalizar el penicilinato de quinina. Su efecto terapéutico, con inclusión del efecto de retardo, es el mismo que cuando se inyecta el penicilinato de quinina en suspensión oleosa. Para hacer indolora la inyección, se debe añadir un anestésico, tal como para-amino-benzoato de butilo. El procedimiento indicado puede ser aplicado a las diversas sales de penicilina, así como a las bases del grupo de la quinina y de otros alcaloides; para una mejor comprensión, los autores proponen un ejemplo práctico²⁹⁵.

Esta misma empresa, *Les Laboratoires Français de Chimotherapie*, presentó con fecha de 7 de marzo de 1952, un “Primer certificado de adición por perfeccionamientos introducidos en el objeto de la patente principal nº 192.353, expedida el 22 de febrero

²⁹⁴ AHOEPM, patente 192.353; la memoria descriptiva consta de cinco hojas, mecanografiadas por una sola de sus caras, firmada en Madrid a 30-III-1950; la memoria se corresponde con la presentada, ante la Administración francesa, el 25-V-1949, bajo el número 572.940. El solicitante figura como establecido en París, en el 89 *rue* de Cherche-Midi. La patente española fue concedida el 22-II-1951 y publicada el 16-III-1951.

²⁹⁵ Se prepara el disolvente, es decir la solución de la sal de quinina, para ello se disuelven 14 g. de formiato de quinina y 1 g. de para-amino-benzoato de butilo en 25 cm³ de propileno-glicol; se añaden 35 cm³ de agua bidestilada y se completa un volumen de 100 cm³ con propileno-glicol. Esta solución se ha de filtrar; después de filtrada, se reparte en ampollas a razón de 1,6 cm³ y se esteriliza. El frasco de penicilina contiene, en forma seca, 300.000 U.I. de penicilina G cristalizada (en forma de sal de potasio), estéril, en polvo microcristalino (de 185 a 2.000 mg.). Para administrar una inyección a un paciente, se ha de disolver el contenido de un frasco de penicilina usando una ampolla de disolvente (solución de la sal de quinina). La solución que resulte debe inyectarse lo más rápido posible al enfermo, en las zonas musculares apropiadas.

de 1951, y que recae sobre ‘un procedimiento de preparación de soluciones de penicilina de efecto prolongado’²⁹⁶. Esta adición va dirigida a proponer nuevos agentes estabilizadores, tales como goma arábica y polivinil-pirrolidona, y nuevas bases orgánicas, como emetina ($C_{29}H_{40}N_2O_4$) y amino-difenil-metano o benzo-hidril-amina (C_6H_5)₂CH-NH₂. Como en la patente principal, las combinaciones de penicilina con efecto retardado se obtienen extemporáneamente al reaccionar una sal soluble de penicilina sobre una u otra sal de estas bases, utilizadas en estado de sal y disueltas en la mezcla del agente estabilizador-agua²⁹⁷.

2.2.3.h. Resistencias a penicilinasas

En las muestras comerciales de penicilina era habitual, al menos en el tránsito de las décadas de 1940 a 1950, la presencia de un fermento que, aunque se presente en cantidades muy pequeñas, actúa específicamente sobre la penicilina; éste es difícil de separar de la penicilina comercial de modo absoluto, durante el proceso de fabricación, por lo que bastan indicios en el producto resultante para que ejerza su acción perjudicial sobre la estabilidad de la penicilina. Se trata de la penicilinasas, la cual, como la mayor parte de los fermentos, es de naturaleza proteica por lo que sufre la acción de las proteinasas que, en cambio, no actúan sobre la penicilina.

La solución pasa por transformar la penicilina sódica comercial en un producto resistente a la penicilinasas intestinal, apta por tanto para su administración oral; y para ello se diseñaron tanto fórmulas extemporáneas como industriales. Las contribuciones, a tenor de la información obtenida en el registro de patentes, parte de empresas e investigadores del ámbito mediterráneo: españoles y franceses.

Con fecha 8 de septiembre de 1949, el médico catalán Enrique Bassas Grau presentó ante el registro de patentes un expediente para proteger “Un procedimiento para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones de penicilina, activas por vía gástrica o inyectables”²⁹⁸. El autor describe un procedimiento con el que, en su

²⁹⁶ AHOEPM, patente 202.360; la memoria descriptiva consta de siete hojas, mecanografiadas por una sola de sus caras, firmada en Madrid, a 7-III-1952; la memoria se corresponde con la presentada ante la Administración francesa, el 6-IV-1951, bajo el número 49.273/51. El solicitante figura como establecido en París, en el 97 rue de Vaugirard. La patente española fue concedida el 10-III-1952 y hecha pública el 1-IV-1952.

²⁹⁷ Los autores proponen, a título de ejemplos no limitativos, algunas maneras de realizar este procedimiento; señalamos el primero de los cuatro que se insertan en la memoria: en 100 cm³ de agua destilada, que contienen como excipiente estabilizador inyectable, que aumenta la viscosidad de la mezcla, 2 g. de goma arábica, se disuelven 2,5 g. de clorhidrato de emetina oficial ($C_{29}H_{40}N_2O_4$, 2.HCl, 3.H₂O). La solución obtenida se introduce en ampollas de 2 cm³ cada una y se esteriliza. La penicilina, en forma de polvo estéril seco (por ejemplo penicilinato sódico), se distribuye en frasquitos a razón de 200.000 U.I. por frasco. Poco antes de la inyección, el polvo de penicilina se disuelve con el disolvente contenido en la ampolla; la combinación de penicilinato de emetina se efectúa poco a poco y se mantiene en forma coloidal por el excipiente estabilizador. Tras administrarla al paciente, en el punto de inyección ocurre una precipitación completa de penicilinato de emetina, muy poco soluble en agua, lo que permite obtener una acción prolongada y simultánea de penicilina y de emetina; de modo que cada uno de estos dos componentes desempeña su propia función terapéutica, con un efecto retardado.

²⁹⁸ AHOEPM, patente 186.907; la memoria descriptiva consta de cinco hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 8 de septiembre de 1949; como domicilio de Enrique Bassas figura el número 12 del Paseo de Gracia, en Barcelona. La patente fue concedida el 13-IX-1949 y hecha pública el 1-XII-1949.

opinión, se logra que la penicilina sódica comercial sea inatacable por el jugo gástrico y, por tanto, no sea inactivada por la penicilinasas intestinal. Con ello pretende conseguir que la administración de penicilina por vía oral tenga la misma eficacia y se dosifique de igual modo que como se hace en la administración parenteral.

Para lograr estas mejoras en la penicilina sódica comercial, ésta ha de ser sometida a una transformación que la convierta en una sal de penicilina-aluminio (o penicilina-cobalto), que es activa por vía gástrica. Para conseguir tal transformación, se limita a agregar, a la penicilina comercial, una sal de aluminio o una sal de cobalto, como podía ser el cloruro de aluminio o el cloruro de cobalto; las sales indicadas se añaden en forma de solución precipitante, en una proporción de unos 2 cc. de sal al 2% por cada 200.000 unidades de penicilina. Es necesario incorporar inmediatamente al producto cristalizado un vehículo estabilizador, formado por p-oxibenzoato de metilo, un ácido benzoico o cualquier derivado benzoico que tenga la propiedad de destruir la penicilinasas intestinal.

La aplicación del procedimiento puede realizarse en el propio frasco de penicilina comercial, dotando a éste de los acoplamientos adecuados para contener, por separado, los elementos de adición que se han indicado. Según el autor, el producto obtenido posee las siguientes propiedades:

- a). No es atacado por el jugo gástrico.
- b). Se disuelve lentamente en el tubo digestivo.
- c). Se absorbe de forma regular.
- d). No es inactivado por la penicilinasas intestinal.
- e). Se elimina lentamente.
- f). Es de sabor agradable.
- g). Requiere las mismas dosis que la administración parenteral.

Algo más de un año después, el 26 de diciembre de 1950, Enrique Bassas Grau presentó, ante el registro de patentes, la solicitud de un certificado de adición por “Mejoras en el objeto de la patente principal, nº 189.651 por ‘Un procedimiento para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones de penicilina activas, por vía gástrica o inyectable’”²⁹⁹. De acuerdo con sus nuevos estudios, ha observado una gran ventaja al emplear los penicilatos de aluminio, cobalto, bismuto y otros metales que forman penicilatos insolubles, cuando estos son administrados por vía gástrica en forma de tabletas, comprimidos, polvos, granulados, grageas y otras preparaciones sólidas que, además de contener los penicilatos indicados, incluyen productos que inhiben la acción de la penicilinasas, tales como el ácido amino-hipúrico y sus sales y derivados, el ácido sulfanílico y sus sales. Los resultados obtenidos son satisfactorios, aunque los preparados farmacéuticos vayan desprovistos de estos agentes de inhibición. Además son empleados agentes activadores de la penicilina, como las sales de ácidos orgánicos e inorgánicos de cobalto y los tampones o reguladores del pH, tales como las mezclas ácido benzoico / benzoato sódico, ácido cítrico / citratos alcalinos, ácido bórico / boratos alcalinos, o glicocola y otros aminoácidos.

²⁹⁹ AHOEPM, patente 195.938; la memoria descriptiva consta de cuatro hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 23 de diciembre de 1950; como domicilio de Enrique Bassas consta el número 12 del Paseo de Gracia, en Barcelona. El certificado de adición fue concedido el 26-XII-1950 y hecha público el 1-II-1951.

El proceso para preparar los productos deseados se inicia, según lo indicado en la patente de referencia, obteniendo los peniciliatos de aluminio, cobalto, bismuto y otros metales, separándolos después por filtración al vacío en atmósfera inerte y a baja temperatura. Los productos obtenidos se secan al vacío en análogas condiciones y al polvo resultante se le añaden las sustancias antes citadas, en la cuantía y proporción que sean convenientes para las aplicaciones ulteriores. Luego se han de someter al correspondiente trabajo mecánico par lograr con ellos fabricar tabletas, comprimidos, polvos, granulados o grageas.

En definitiva, lo que propone este nuevo procedimiento es someter a los penicilinos de aluminio, cobalto, bismuto y otros metales que forman con la penicilina estas sales, a un proceso de separación por filtración al vacío en atmósfera inerte y baja temperatura, desecando el resultado al vacío para así obtener un polvo que puede emplearse bien solo o bien con elementos de adición de acción inhibidora, agentes activadores de la penicilina y tampones de regulación del pH.

Con fecha 14 de octubre de 1952, otra empresa española, el *Instituto de Biología y Sueroterapia*, presentó un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento para estabilizar disoluciones de penicilina”³⁰⁰; éste se fundamenta en la acción de las proteinasas sobre la penicilinas; es posible estabilizar la penicilina en disolución sometiéndola a la acción de una proteinasa que destruya el fermento y no altere la penicilina. Los autores señalan que este procedimiento puede denominarse de ‘ataque’ pues lo que realmente se hace es ‘atacar’ el elemento nocivo que hay en la disolución de penicilina e incapacitarlo para que no ejerza su acción perjudicial. Como es un procedimiento fácil de aplicar, tiene la consideración de comercial.

Junto a éste, los autores presentan una variante que, teniendo el mismo fin, emplea recursos cuya acción no es de ‘ataque’ sino de ‘conurrencia’. Esta variante se fundamenta en estabilizar las soluciones de penicilina mediante la adición de productos que, sin tener la acción farmacológica de la penicilina, presenten una estructura química semejante, para que sobre ellos actúe la penicilinas. Es preciso que estas sustancias adicionales posean el anillo beta-lactámico de la penicilina, pues sobre él es donde se ejerce el efecto hidrolítico de la penicilinas.

2.2.3.i. Formas farmacéuticas especiales

El 11 de septiembre de 1945 un par de empresas británicas, *Herts Pharmaceuticals Limited* y *Roche Products Limited*, presentaron ante el registro de patentes español un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento de fabricación de apósitos para vendajes de cirugía conteniendo penicilina estable”³⁰¹.

³⁰⁰ AHOEPM, patente 205.780; la memoria descriptiva, que consta de cuatro hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras, queda firmada en Madrid, el 14 de octubre de 1952. La empresa tiene su domicilio fiscal en Madrid, en el número 63 de la calle Bravo Murillo. La patente fue concedida el 17-VII-1953 y hecha pública el 16-IX-1953.

³⁰¹ AHOEPM, patente 170.951; la memoria descriptiva consta de nueve hojas, escritas a máquina por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 11 de septiembre de 1945. Las empresas figuran como domiciliados en Bessemer Rod (*Herts Pharmaceuticals Limited*) y Broadwater (*Roche Products Limited*), ambas en Welcyn Garden City (Hertfordshire. Inglaterra). Este procedimiento había sido ya presentado en Inglaterra, con fecha 14 de septiembre de 1944, bajo registro 17.618/44. La patente española fue concedida el 24-XI-1945 y publicada el 16-XII-1945.

En los comienzos de la década de 1940 comienzan a publicarse algunos informes en los que se indica la posibilidad de preparar vendajes quirúrgicos con actividad bacteriostática, haciendo crecer *Penicillium notatum* en tejidos impregnados con una solución nutritiva adecuada³⁰², pero existía el inconveniente de que estos vendajes debían usarse inmediatamente después de alcanzado el máximo de actividad bacteriostática, pues rápidamente pierden esa propiedad. El objeto de esta patente es la preparación de un vendaje quirúrgico seco que contenga penicilina estable, o que retenga su actividad bacteriostática durante un tiempo relativamente largo.

El vendaje al que alude está formado por un material fibroso absorbente³⁰³; se ha de impregnar con una solución estéril de una sal de penicilina que posea un pH entre 5 y 7³⁰⁴; éste se seca hasta conseguir peso constante y se envasa en un recipiente en el cual no penetre la humedad.

El proceso de secado puede realizarse con una corriente de aire o gas inerte, tal como el nitrógeno, siempre a temperaturas elevadas, pero a ser posible que no excedan de 120° C., durante un tiempo de 5 a 10 minutos. Se observó que no había pérdida de actividad en la penicilina, incluso a temperaturas elevadas, aun cuando el secado durara varias horas. Los vendajes impregnados de penicilina pueden ser también secados por medio de una radiación infrarroja, en una corriente de aire o gas inerte, o eliminando el agua que poseen operando al vacío y a bajas temperaturas. Es conveniente realizar el secado al vacío, con un agente reductor, como peróxido fosfórico. Los vendajes así secados retiene la actividad de la penicilina durante varios meses si se ha evitado el contacto con la humedad.

Es posible renovar el contenido penicilínico de los vendajes, humedeciendo éstos con agua estéril y operando en condiciones asépticas. Este método es usado para probar estos vendajes y puede encontrarse un uso práctico si la solución del vendaje se aplica de un modo sistémico³⁰⁵.

³⁰² George H. ROBINSON, Jas. E. WALLACE. "An inoculated penicillin dressing". *Science*, 98(2545): 329-330. Washington DC, 1943; A. J. HOBSON, L. D. GALLOWAY. "Home-made penicillin". *The Lancet*, 243(6283): 164; 243(6285): 230-231. Londres, 1944.

³⁰³ Normalmente el material fibroso es gasa de algodón, aunque pueden usarse otros materiales absorbentes como lana de algodón u otros tejidos, incluso fibras de cristal.

³⁰⁴ Preferentemente se ajusta a pH entre 5.5 y 6.5; esto es posible conseguirlo con penicilina cruda filtrada, conteniendo soluciones metabólicas o soluciones de penicilina pura o soluciones que contengan estas sales.

³⁰⁵ Los autores proponen nueve ejemplos donde muestran el modo de preparar estos vendajes que contienen penicilina estable; comentamos el primero de ellos: un material de gasa de algodón, usado para vendajes en cirugía, se impregnó con una solución acuosa que contenía sales de sodio y potasio de penicilina; la solución tenía un pH aproximado de 6, así como una actividad bacteriostática de 11 U.O./cm³ de solución. El proceso se continuó hasta que el material retuvo una cantidad de solución equivalente a 2/3 de su peso. El material así impregnado se seca en una corriente de aire caliente a una temperatura de 60°-64° C., durante un tiempo aproximado de 7 minutos. Se hizo el experimento de extraer las sales de penicilina, humedeciendo el vendaje seco con un volumen determinado de agua destilada y comprobando que la cantidad total de la penicilina aplicada al vendaje había sido recuperada y mantenía su actividad bacteriostática. También se comprobó que los vendajes así preparados y colocados dentro de un recipiente herméticamente cerrado después del secado mantienen su actividad bacteriostática original durante varios meses, cuando se les conserva a temperatura ambiente.

2.2.4. Penicilinas procaínicas

Uno de los problemas más difíciles de solventar que se originan en el uso terapéutico de la penicilina, al menos en los últimos años de la década de 1940, es el desarrollo de métodos para prolongar su acción en el cuerpo humano. La penicilina se elimina por excreción mediante la orina; ello hace difícil mantener niveles terapéuticos en sangre, excepto cuando la sustancia se administra por inyección intravenosa constante o por frecuentes inyecciones intramusculares.

Durante la década de 1940 se realizan esfuerzos para prolongar la acción terapéutica de la penicilina centrados en conseguir la disminución de la absorción o retardar la excreción desde el cuerpo; los métodos que tuvieron más éxito fueron los que emplean emulsiones de penicilina-aceite, a los que nos hemos referido líneas arriba; mezclas de penicilina-aceite-pectina, mezclas de penicilina-gelatina combinadas con un vasoconstrictor, mezclas de penicilina y alumbre y mezclas de penicilina-cera de abejas-aceite. También se desarrollaron algunas técnicas para retardar la velocidad de excreción de la penicilina en el cuerpo, tales como la inyección simultánea de 'diodrast' (nombre comercial del yodo piruvato) y ácido para-amino-hipúrico.

Pese a las ventajas que reportan los prolongados niveles de penicilina terapéuticos en la sangre, por medio de una sola inyección de penicilina con un vehículo de cera y aceite, el método presenta algunas inconvenientes; la presencia de la cera en este vehículo fue causa de cierto número de reacciones locales desfavorables, tales como la sensibilización del paciente y la reacción alérgica resultante; la cera de abejas se absorbe con dificultad y requiere de veinticinco a treinta días para la asimilación completa.

En el sentido directo de retardar la absorción, se ensayaron diversas sales de penicilina; se observó que las sales usuales de sodio, potasio y calcio eran tan solubles y rápidamente absorbidas y eliminadas como la penicilina misma. Pero se encontró que la sal que forma la penicilina con un cuerpo amínico, clorhidratato de para-amino-benzoil-dietilamino-etanol, el penicilato de procaína, es insoluble en agua y, al ser inyectado en los tejidos, se disuelve lentamente, prolongando así su acción terapéutica durante el tiempo que está en relación con la cantidad del producto insoluble que se inyecta. La sal de penicilina con procaína (penicilinato de procaína) es un polvo blanco cristalino.

Con la fórmula procaína-penicilina se consiguen niveles altos de penicilina en sangre durante un período largo de tiempo, desplazando en la mayoría de los países a los preparados de penicilina en aceite y cera. La procaína-penicilina tiene carácter de semi-solubilidad, lo que hace que sea absorbida más lentamente y los niveles terapéuticos activos en sangre se mantengan durante un tiempo más largo.

El tamaño y la forma de las partículas son de gran importancia; no se pueden inyectar partículas grandes ya que la aguja de inyecciones se obstruiría y las partículas demasiado pequeñas se reabsorben rápidamente, de modo que no es posible lograr el efecto prolongado deseado. La forma de la partícula es también de importancia, en especial en el acto de la inyección, pues las partículas largas (los cristales aciculares) tienen tendencia a obstruir la aguja de las inyecciones.

2.2.4.a. Sales de procaína y penicilina

El 17 de julio de 1948 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presenta, ante el registro de patentes español, un expediente para proteger, por

veinte años, la invención de “Un método para producir una sal de penicilina”³⁰⁶. Los autores plantean la producción de una sal de penicilina por precipitación a partir de una solución de la penicilina libre, en un disolvente orgánico, en forma de concentrado oleoso o cristalino³⁰⁷, también se ocupan de la obtención de sales de penicilina con aminas terciarias, como productos nuevos.

Según los autores de esta memoria, la producción de un concentrado anhidro -o virtualmente anhidro-, se puede obtener añadiendo una amina terciaria a una solución de penicilina, en un disolvente orgánico. Como resultado se separa un producto que contiene penicilina en forma de sales con la amina empleada; estas sales, en estado oleoso impuro, pueden ser el material de partida para posteriores procedimientos de purificación, que han de llevarse a cabo en ausencia de agua. Los productos así obtenidos pueden emplearse, también, para producir directamente las sales amínicas de penicilina en estado puro.

La amina que se emplea como agente precipitante es la trietil-amina, consiguiendo con ello un precipitado que contendrá la penicilina con buen rendimiento. En otra propuesta de este mismo expediente se usa como agente precipitante dietil-amino-etil-p-amino-benzoato (procaína); esta amina terciaria es empleada como anestésico local, produce un precipitado cristalino, cuando se obtiene de acuerdo con el método propuesto, que contiene penicilina, con buen rendimiento cuando el agente precipitante se usa en proporciones estequiométricas. Este precipitado puede emplearse como materia prima para fabricar sales de penicilina o usarse directamente como sal de penicilina para fines terapéuticos.

Como disolvente puede utilizarse éter o acetato de amilo, o bien estos disolventes pueden mezclarse con acetona. Para que la precipitación sea la adecuada, el disolvente debe secarse con un producto del tipo del sulfato sódico anhidro; se produce entonces un precipitado oleoso o cristalino. Si el precipitado es cristalino, los cristales pueden lavarse con acetona o etanol, aunque en algunos casos es posible realizar el lavado con agua; a continuación la sal se seca y se obtiene, de este modo, en la forma pura³⁰⁸.

En definitiva, la propuesta se centra en un método de obtención de sal de penicilina, consistente en obtener, primero, una solución anhidra de penicilina en un disolvente orgánico y, a continuación, añadir dietil-amino-etil-para-amino-benzoato para que precipite la sal de penicilina con dicha amina.

³⁰⁶ AHOEPM, patente 184.612; la memoria descriptiva consta de seis hojas, escritas por una sola cara, firmadas en Madrid, a 17 de julio de 1948. Esta solicitud se corresponde con la presentada ante la Administración danesa el 19 de julio de 1947, bajo el número 2754/47. La entidad figura establecida en el 19, Bronshøjvej de Copenhague (Dinamarca). La patente española fue concedida el 17-XI-1948 y publicada en 16-XII-1948.

³⁰⁷ Si el concentrado es oleoso, se usará como materia prima para posteriores procesos de purificación; si fuese cristalino, se puede emplear como preparación final de la penicilina, lavándose primeramente con un disolvente orgánico o volviéndolo a cristalizar.

³⁰⁸ Los autores acompañan su descripción con un par de ejemplos aclarativos; reseñamos uno de ellos: una solución formada por 2.08 g. de dietil-amino-etil-p-amino-benzoato y 12 cm³ de acetato de amilo, se adiciona a una solución deshidratada de penicilina en acetato de etilo (grado de pureza: 450 U.I./mg.); se origina un precipitado de un aceite que, al reposar, solidifica formando una masa de cristales de la sal de penicilina con dicha amina terciaria. Se filtra y los cristales se lavan con agua y se secan. Se obtuvieron 3,3 g. de la sal que poseían 950 U.I./mg., lo cual corresponde a un rendimiento del 90% del máximo teórico.

El 7 de octubre de 1948, la empresa norteamericana *Bristol Laboratories Inc.* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a “Un método para producir una sal procaínica de penicilina”³⁰⁹. Los investigadores de la empresa *Bristol Laboratories Inc.* proponen hacer reaccionar una sal de penicilina con una sal de procaína³¹⁰, para obtener una sal procaínica de penicilina cristalizada³¹¹. Estos productos pueden administrarse por cualquiera de los métodos usuales y en cualquiera de los vehículos habitualmente empleados: inyectarse con aceite de cacahuete y cera de abejas, aceite de cacahuete y pectina o con aceite de cacahuete solo; también pueden administrarse oralmente en forma de tabletas, píldoras o cápsulas del tipo de gelatina blanda o de gelatina dura.

Con fecha 10 de junio de 1950, la compañía danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó a registro un expediente para proteger, mediante una patente de invención, por veinte años, “Un procedimiento de preparar precipitados cristalinos de una combinación difícilmente soluble adecuada para las inyecciones de penicilina y bases orgánicas, especialmente la llamada procaína-penicilina”³¹². Es posible, según estos autores, regular -dentro de amplios límites- el tamaño de los cristales y, además, obtener un producto muy homogéneo en cuanto a dicho tamaño, los preparados que se obtienen mediante este procedimiento se pueden emplear directamente para preparar suspensiones aptas para ser inyectadas, mientras que los obtenidos hasta este momento [1950] se han de triturar, lo que implica pérdidas y riesgo de infectar el preparado.

La característica de este método es que las soluciones acuosas de una sal soluble de penicilina y de la base en cuestión se mezclan en presencia de un número determinado de gérmenes de cristalización. Al juntar los componentes de la reacción ocurre un constante crecimiento de los gérmenes de cristalización; modificando el

³⁰⁹ AHOEPM, patente 185.490; la memoria descriptiva consta de seis hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 7 de octubre de 1948. Esta solicitud se corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 27 de octubre de 1947, bajo el número 782.466/47. La entidad se encuentra establecida en Chimes Building, Syracuse (Nueva York, EE. UU.). La patente española fue concedida el 18-XII-1948 y hecha pública el 1-II-1949.

³¹⁰ La procaína es el para-amino-benzoato-(dietilamino)-etílico, de fórmula estructural $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOCH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$.

³¹¹ El inventor propone un par de ejemplos; reseñamos el primero de ellos: se disuelve 1 g. de penicilina sódica en 5 cm³ de agua; la penicilina se extrae con éter di-etílico a pH de 2 a 2,5; este extracto etéreo se lava con agua y se seca con sulfato sódico. A la solución etérea ácida de penicilina se le añade un 30% en volumen de acetona; a continuación se añade una solución de procaína en éter cuyo pH sea 6.5. La mezcla se deja reposar durante unos cinco minutos a la temperatura ambiente; se forman cristales de penicilina-procaína. Estos cristales se separan por filtración, se lavan con éter y acetona y se secan al vacío. La recuperación total de la penicilina inicial fue del 94%. Se determinó la potencia de la penicilina recuperada y los resultados obtenidos fueron: ensayo yodométrico: 1.020 U.O./mg.; ensayo biológico: 1.000 U.O./mg.

Pueden emplearse otros disolventes distintos de la acetona, por ejemplo etanol, propanol o butanol. Análogamente, también puede usarse otros disolventes orgánicos, además del citado éter dietílico, tales como acetato de amilo, acetato metil-amínico o metil-isobutil-cetona.

³¹² AHOEPM, patente 193.361, la memoria descriptiva consta de nueve hojas, escritas por una sola cara, firmadas en Madrid a 10 de junio de 1950; esta solicitud se corresponde con la presentada en Dinamarca el 11-VI-1949, bajo el número 1972/49. La empresa se encuentra establecida en el 19 Bonshøjvej, Copenhague (Dinamarca). La patente española fue concedida con anterioridad al 1-VIII-1951, fecha de su publicación.

número de dichos gérmenes se puede regular el tamaño final que tendrán los cristales. El método permite cesar de añadir uno o los dos componentes de reacción a una cantidad dada del material de injerto cuando se ha obtenido el tamaño deseado de cristal, o bien calcular la cantidad de precipitado que se formará, correspondiente a una cantidad dada de material de injerto. Este material de injerto es, preferentemente, procaína-penicilina, que puede producirse por trituración.

Para conseguir el efecto deseado conviene usar una suspensión de gérmenes de cristalización de la cual se eliminan aquellos cuyo tamaño sea muy próximo al de los cristales del producto final, así como los gérmenes demasiado pequeños. Si la procaína-penicilina que se desea obtener tiene un tamaño de cristal entre 90 y 150 micras, se debe usar, aproximadamente, 300.000 millones de gérmenes de tamaño inferior a 45 micras por cada kg. de penicilina usado. Si se desea que el tamaño de la mayor parte de los cristales esté comprendido entre 50 y 100 micras, se deben emplear 400.000 millones de gérmenes del citado tamaño por kg. de penicilina.

Una aglomeración del material de injerto produce formación de partículas mayores en el producto final; esto se puede impedir, según los autores de este procedimiento, añadiendo un agente dispersante a la fase desde la cual tiene lugar la cristalización; un ejemplo de este tipo de agente, citado por los autores de la memoria que nos ocupa, es el 'Tween 80', fabricado y comercializado por *Atlas Powder Company* (Wilmington, Delaware, EE. UU.)³¹³.

³¹³ El autor ilustra su procedimiento con un par de ejemplos; exponemos el primero de ellos: una cantidad de 60 g. de procaína-penicilina se tritura durante cuatro horas en un molino de bolas, junto con una solución de un agente dispersante; el producto triturado se diluye con agua hasta 1.500 cm³ y se sedimenta repetidas veces hasta que el tamaño de los cristales está comprendido entre 0,5 y 45 micras. La sedimentación puede operarse separando primero el material que contenga un tamaño de partículas superior a 45 micras; esto se puede realizar en uno o más procesos de sedimentación, separando la parte de sedimentación más rápida cierto tiempo después de iniciarse el proceso de sedimentación. El material más fino, que es el que se separa más lentamente, se puede aislar de la parte restante por uno o más procesos de sedimentación, quedando así un resto compuesto esencialmente de partículas fáciles de observar y de contar al microscopio. Contando al microscopio se determina el número de cristales por cm³; si no se realizan ulteriores recuentos de comprobación y determinación del tamaño máximo de partículas, la suspensión sólo puede mantenerse por un tiempo limitado, por ejemplo de un día al siguiente, y entonces sólo por agitación vigorosa.

Una cantidad de 1 kg. de la sal potásica de penicilina se disuelve en 19 litros de agua y se produce una solución saturada de procaína-penicilina añadiendo unos 60 g. de hidro-cloruro de procaína y algún agente dispersante, agitando y filtrando. La solución se deja en un recipiente de precipitación, que esté provisto de una camisa refrigerante y de mecanismos agitadores; se enfría a 10°-12° C y a continuación se añade una cantidad de material de injerto, que contiene 300.000 millones de cristales. La solución se deja en reposo toda la noche. Luego se le añaden, a gotas, 800 g. de hidro-cloruro de procaína disueltos en 8 l. de agua que contienen 80 g. de agente dispersante, por medio de un embudo separador, durante un tiempo de 6 horas, agitando continuamente. Terminada la adición, la suspensión se pasa por un tamiz mecánico cuya tela tiene una anchura de malla de 75 micras y está en contacto con cuchillas giratorias que sirven para distribuir las partículas y limpiar el tamiz. Del líquido tamizado se separa la sal de procaína por filtración y se lava con agua destilada, luego se seca.

El rendimiento fue de 1.300 g. de procaína-penicilina, que corresponde al 80% del teórico. La potencia es de 980 U.I./mg. a 1.000 U.I./mg. El tamaño de cristales está comprendido entre 80 y 100 micras; en el preparado no se observan cristales aciculares.

Las soluciones de la sal potásica de penicilina, de hidrocloruro de procaína y todos los líquidos usados para la dilución deben ser estériles y libres de borra, todos los recipientes y aparatos han de estar esterilizados y las operaciones realizarse en soluciones de esterilidad.

Apenas unos días después, el 19 de junio de 1950, esta misma empresa danesa, *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, presenta ante la Administración española una solicitud de patente de invención, por veinte años, para proteger “Un método de producir una sal difícilmente soluble de bencil-penicilina con bases orgánicas, especialmente procaína”³¹⁴. En este método, el compuesto cristalino que forma la penicilina G libre con éter di-isopropílico³¹⁵ se usa, en lugar de una sal, como intermedio para separar bencil-penicilina de las otras clases de penicilinas presentes. Este compuesto es fácilmente soluble en diferentes disolventes orgánicos, como el éter y acetato de etilo, en los cuales las bases orgánicas adecuadas, tales como la procaína, son también solubles. Cuando está disuelto en dicho disolvente, el compuesto de éter di-iso-propílico con bencil-penicilina es capaz de reaccionar con bases orgánicas, tales como la procaína, formando procaína-penicilina de bencil-penicilina o el compuesto correspondiente con otras bases orgánicas similares.

La producción de la sal procaínica de bencil-penicilina, según este método, puede llevarse a cabo de la forma siguiente: a una solución de penicilina impura en acetato de etilo o éter se le adicionan 2 a 4 volúmenes de éter di-iso-propílico. La mezcla se deja reposar durante un período de tiempo corto y el compuesto de éter di-iso-propílico y bencil-penicilina se separa por cristalización, quedando en disolución las otras penicilinas. La sustancia cristalizada se separa por filtración y se disuelve de nuevo en acetato de amilo. Después se añade algo de alcohol, sobre ¼ de volumen, junto con una solución de procaína en acetato de amilo, en cantidad tal que dé un exceso de procaína. Se deja reposar en frío y se separa por cristalización la sal pura de procaína-bencil-penicilina³¹⁶.

El 13 de marzo de 1951 la empresa norteamericana *Eli Lilly and Company* presentó, en el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, “Un procedimiento de preparar sales insolubles de penicilina”³¹⁷, mediante el empleo de 2-cloro-procaína, o una sal de adición ácida de la misma, en un disolvente de reacción en el cual la sal 2-cloro-procaína de la penicilina es relativamente insoluble, para obtener así un precipitado de penicilina y recuperar ésta.

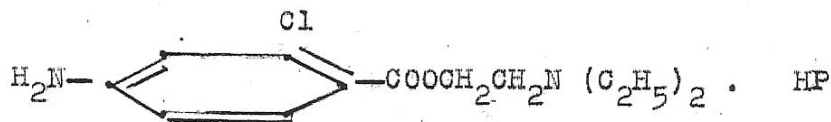
³¹⁴ AHOEPM, patente 193.494; la memoria descriptiva consta de seis hojas, escritas por una sola cara, firmadas en Madrid a 19 de junio de 1950; esta solicitud se corresponde con la presentada en Dinamarca el 20-VI-1949, bajo el número 2072/49. La empresa se encuentra establecida en el 19 Bonshøjvej, Copenhague (Dinamarca). La patente española fue concedida el 10-VII-1951 y hecha publica el 1-VIII-1951.

³¹⁵ Tal como queda descrito por Nelson R. TRENNER, Rudolf P. BUHS. “A crystalline form of benzylpenicillinic acid”. *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2897-2900. Washington DC, 1948.

³¹⁶ Los autores ilustran su método por medio de un ejemplo: se añaden 6.000 cm³ de éter a 200 cm³ de una solución de penicilina impura en acetato de amilo (grado de pureza: 750 U.I./mg.; potencia: 103.000 U.I./cm³). La mezcla se deja en reposo durante dos horas a una temperatura de 0° C; se forma un precipitado cristalino que se separa por filtración. El precipitado se disuelve en 150 cm³ de acetato de amilo y 30 cm³ de alcohol, se añade una solución de 10 g. de procaína en 60 cm³ de acetato de amilo. Se deja en reposo cuatro horas y se separa por filtración la procaína-penicilina que ha precipitado; el producto obtenido es blanco y cristalino y la potencia es de 1.000 U.I./mg. El rendimiento, calculado sobre la cantidad de bencil-penicilina usada, varía entre 65%-70%.

³¹⁷ AHOEPM, 196.992; la memoria descriptiva consta de once hojas, escritas a máquina por una sola cara y firmada en Madrid a 13 de marzo de 1951; como domicilio social de la empresa figura el 740 de Alabama Street, Indianápolis (Indiana, EE. UU.). La patente española fue concedida el 28-II-1953 y publicada el 1-IV-1953.

Esta nueva sal de penicilina muestra pequeña solubilidad en agua y en los disolventes orgánicos comunes, disponiendo así de un medio conveniente de aislar la penicilina de sus soluciones. La nueva sal de penicilina, cuando es administrada en forma adecuada, origina una concentración sanguínea de penicilina de eficacia terapéutica durante un período de 24 horas o aún mayor.



Sal 2-cloro-procaínica de penicilina. [HP representa la forma ácida de la penicilina]

Esta nueva sal se prepara por reacciones químicas de adición de metátesis: la forma ácida de penicilina³¹⁸ se hace reaccionar con 2-cloro-procaína básica; o bien una sal metálica o similar de penicilina se hace reaccionar con una sal de adición ácida de 2-cloro-procaína, realizándose con preferencia las reacciones en un disolvente en el cual sean solubles todos los componentes químicos, excepto la sal 2-cloro-procaínica de penicilina³¹⁹.

Terminan los autores su memoria descriptiva especificando el modo de preparación de 2-cloro-procaína: una mezcla formada por 64 g. de ácido 2-cloro-4-nitro-benzoico y 40 ml. de cloruro de tionilo se calienta a reflujo en un baño de vapor durante cuatro horas; se forma cloruro de 2-nitro-4-cloro-benceno; la mezcla se destila y el compuesto dicho, que hierve a 150° C y 8 mm. de presión, se recoge. A una solución en reflujo de 28,6 g. de beta-dietil-amino-etanol en 500 ml. de benceno se añaden lentamente y con agitación 53,5 g. de cloruro de 2-cloro-4-nitro-benzoico; el reflujo continúa una hora después de terminada la adición; la mezcla se enfría y la sal de hidrocloreto de 2-cloro-4-nitro-benzoato de beta-dietil-amino-etilo, que ha precipitado, se separa por filtración y se purifica volviéndola a cristalizar en etanol. Se toman 55 g. de hidrocloreto de 2-cloro-4-nitro-benzoato-beta-dietil-amino-etílico y se disuelven en 150 ml. de agua, se añaden 0,5 g. del catalizador de Adams (PtO) y la mezcla se hidrogena a la presión de unos 25 kg.; la mezcla se filtra para separar el catalizador y se evapora a sequedad; el residuo, consistente en hidrocloreto de 2-cloro-procaína, se funde a unos 170°-171° C. Se obtiene la base 2-cloro-procaína disolviendo hidrocloreto en agua, alcalinizando la solución con hidróxido sódico, extrayendo con éter la 2-cloro-procaína, que se separa como aceite y evaporando el éter.

³¹⁸ De manera expresa, los autores señalan que el término 'penicilina' debe entenderse de manera genérica, agrupando las diversas penicilinas particulares que se sabe producidas por los métodos habituales de crecimiento del moho en estos comienzos de la década de 1950: la penicilina G (bencil-penicilina), penicilina F, penicilina dihidro-F, penicilina K, penicilina X y similares.

³¹⁹ En la memoria se incorporan media docena de ejemplos; comentamos el primero de ellos: se disuelven 40 g. de bencil-penicilina sódica en 5 l. de agua fría (5° C); la solución se lleva a pH 2,2 con la cantidad necesaria de ácido sulfúrico. La solución acuosa se extrae con unos 5 l. de acetato amílico; a este extracto, que contiene bencil-penicilina en su forma ácida, se le añaden lentamente, y agitando con fuerza, 500 ml. de una solución fría de acetato amílico que lleva disueltos 32 g. de 2-cloro-procaína. Se separan unos cristales blancos de la sal 2-cloro-procaínica de la bencil-penicilina; estos cristales se separan por filtración, se lavan con acetona y se secan en una cámara al vacío.

El 4 de mayo de 1951 será una empresa sueca, Aktiebolaget *Kabi*, quien se interese por patentar, en España, “Un procedimiento de producir preparados de sales de penicilina”³²⁰; se trata de suspensiones en agua de sales de penicilina relativamente poco solubles, capaces de conservarse durante un tiempo mayor, lo que hace posible una producción y distribución racionales, al permitir almacenarlas. El preparado se suministra listo para su empleo y reúne en sí las ventajas de los productos acuosolubles con las de las suspensiones oleosas, sin los inconvenientes de ninguna de estas dos formas.

Este preparado de penicilina estable tiene una fase líquida, que contiene la sal disuelta con un catión (es decir, la solución acuosa), y una fase sólida (es decir, la sal de penicilina escasamente soluble, que ha sido puesta en suspensión). La fase acuosa puede contener también otras sustancias, para otros fines, como pueden ser coloides hidrófilos para retardar la sedimentación de la suspensión durante las operaciones previas a la inyección y en el momento de realizar ésta o agentes de conservación y sales neutras para dar a la sangre la necesaria isotonicidad.

La pérdida de penicilina disponible que ocurre en una suspensión de sal de penicilina relativamente poco soluble en agua, como puede ser la procaína-penicilina, no se debe a la descomposición de la penicilina en los cristales suspendidos de esa sal de penicilina; se debe a que estas sales de penicilina, relativamente poco solubles, tienen una cierta solubilidad en agua, aunque ésta sea limitada. Es la parte de la sal de penicilina que está en solución la que gradualmente se descompone y, a medida que ello ocurre en la solución acuosa, nuevas cantidades de la sal de penicilina pasan a la solución, y sigue así el proceso de descomposición de la penicilina. En consecuencia, la cantidad de dicha sal de penicilina en la suspensión disminuye en una proporción que depende, en primer lugar, de la cantidad de penicilina que existe en la solución y, en segundo lugar, de la proporción a la cual se descompone la penicilina existente en la solución.

La disminución de la solubilidad de la sal de penicilina escasamente soluble en la fase líquida se puede conseguir disolviendo en el agua una sal acuosoluble que tiene el mismo catión que el de la sal de penicilina y en cantidades practicables desde los puntos de vista de la producción y el uso. La reducción de la descomposición total de la penicilina se reduce, en tal manera, que las suspensiones resultantes conservan su eficacia en penicilina durante un tiempo satisfactorio.

Cuando son preparadas suspensiones acuosas de procaína-penicilina de acuerdo con este procedimiento, el catión procaína, en forma de su hidrocloreto, se disuelve en la fase acuosa³²¹. Cada inyección normal contiene, aproximadamente, 10 mg. de hidrocloreto de procaína, cantidad que al ser administrada por vía intramuscular no produce ningún efecto perjudicial; es más, esta adición proporciona una ventaja adicional porque, debido a su efecto anestésico local, el hidrocloreto de procaína reduce

³²⁰ AHOEPM, patente 197.713; la memoria descriptiva consta de dieciocho hojas escritas a máquina, por una sola cara, queda firmada en Madrid, a 4 de mayo de 1951. La empresa figura como domiciliada en Estocolmo (Suecia). La patente española fue concedida el 5-V-1951 y publicada el 1-VI-1951.

³²¹ La procaína es un anestésico local que sólo es tolerado en dosis relativamente pequeñas; pero se ha comprobado que es practicable añadir la suficiente procaína para obtener una solución de ca. 1% de hidro-cloruro de procaína.

las posibles molestias que puedan sentirse en la inyección³²². Normalmente la sal de penicilina poco soluble que se emplea es procaína-bencil-penicilina; para explicar cómo puede producirse una suspensión acuosa almacenable de esa sal de penicilina, de acuerdo con el procedimiento objeto de esta patente, los autores proponen unos ejemplos³²³.

El modo de producción puede variar dentro de amplios límites. El contenido en hidrocloreuro de procaína cambia según el grado de almacenaje o de conservación que se desee; la fase líquida puede contener una proporción muy pequeña de hidrocloreuro de procaína disuelta en agua, del orden del 0,1%, pues tan pronto como algo de hidrocloreuro se incluye en el agua contribuye a lograr un efecto conservador notable. Se puede usar una solución de más del 1% de hidrocloreuro de procaína, por ejemplo el 2%, e incluso hasta el 4% o más, mientras su concentración esté por debajo de aquella a la cual el preparado es inocuo a la dosificación a la que se debe prescribir la suspensión. También puede emplearse aluminio-bencil-penicilina en cantidad tal que se obtenga una suspensión de 3.000.000 U.I. de penicilina por 10 ml. de suspensión; entonces el hidrocloreuro de procaína se sustituye por una concentración adecuada de una sal de aluminio no tóxica, como puede ser sulfato de aluminio; se puede usar en la misma concentración mínima que para el hidrocloreuro de procaína, una solución al 2% es un valor razonable para evitar cualquier sensación punzante debida al carácter astringente del sulfato de aluminio, y no conviene pasar de esta valor; una concentración práctica recomendada es 0,5%. Este mismo procedimiento puede ser también aplicado a otros preparados acuosos de penicilina, como podían ser los ungüentos acuosos; e incluso en la producción de preparados que en su estado final no contengan agua, pero sí en el transcurso de su producción, como las pastillas que contienen penicilina.

Para comprobar la estabilidad incrementada de los preparados de procaína-bencil-penicilina, los autores realizaron algunas pruebas, todas ellas a una temperatura de 40° C, a la cual la velocidad de deterioro de la penicilina queda acelerada en comparación con la temperatura de almacenamiento normal, que es del orden de 10° a 15° C. Los experimentos se realizaron de la siguiente forma: se sometieron al ensayo un gran número de frascos que contenían procaína-bencil-penicilina 300.000 U.I./ml. y varias cantidades de hidrocloreuro de procaína; cada cierto intervalo, se analizaron tres frascos de cada tipo de preparado, con vistas a determinar la cantidad de penicilina remanente, cada valor se tomó como el valor medio de, al menos, seis determinaciones. Los datos observados permiten deducir que los preparados más estables se obtuvieron después de una adición extra de 1% o 2% de hidrocloreuro de procaína, referido a la cantidad de la solución acuosa.

El 31 de mayo de 1951 *Bristol Laboratories Inc.* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, una invención relativa

³²² La cantidad de procaína administrada con la procaína-penicilina en una inyección normal, como unos 120 mg., es ciertamente mucho mayor, pero como se presenta en forma de sal que se disuelve lentamente, no ejerce un efecto anestésico.

³²³ De los tres ejemplos que se presentan en la memoria, reseñamos el primero: se introducen 3,3 g. de procaína-bencil-penicilina, en condiciones estériles, en un frasco que contiene 10 bolitas de vidrio; a continuación, manteniendo siempre las condiciones estériles, se añaden 8,4 ml. de una solución acuosa al 15% de hidro-cloruro de procaína, que contiene 15% de carboxi-metil-celulosa sódica de baja densidad, 0,7% de cloruro de sodio y 0,1% de para-oxi-benzoato de metilo como preservativo. El frasco se cerró en la forma usual. El producto final es 10 ml. de una suspensión con 3.000.000 U.I. de penicilina.

a un “Procedimiento para obtener una sustancia acuosa de penicilina-procaína G”³²⁴. El autor de este procedimiento, Frank Harold Buckwalter³²⁵, pretende obtener una suspensión acuosa, estable y esterilizada, de penicilina-procaína G que contenga exceso de iones de procaína y un agente de suspensión tal que, al ser administrada, origine niveles sanguíneos eficaces, cuya duración sea mayor que las correspondientes a los originados por las composiciones acuosas conocidas hasta los comienzos de la década de 1950.

En esta fórmula, el índice de la procaína, que puede estar en forma de base libre (fosfato, hidrocloreto o cualquier otra forma de procaína inyectable), se halla entre 0,5% y 5,0% por peso de la composición total, usándose preferentemente al 2,0%. El agente de suspensión más satisfactorio ha sido carboxi-metil-celulosa, aunque de igual utilidad resultan metil-celulosa, goma tragacanto, gelatina, pepsina, alginatos sódicos, goma caraya y análogos. La cantidad de agente de suspensión varía en cierta proporción, pero generalmente se emplea entre 0,5% a 5,0%, preferentemente se usa entre el 0,5% y el 2,5 %.

La suspensión final de penicilina-procaína G puede tener una potencia de 100.000 hasta 500.000 U.I./ml., preferentemente de 100.000 a 400.000 U.I./ml.; un valor de la potencia de una suspensión de penicilina-procaína G de *ca.* 300.000 U.I./ml. se considera óptimo y de entera satisfacción.

La composición del preparado no queda limitada a los componentes antes citados, se pueden agregar otros: una pequeña cantidad de un preservativo³²⁶, de un vasoconstrictor³²⁷ u otros ingredientes que mejoren los niveles sanguíneos, las propiedades de manipulación o la estabilidad del producto³²⁸.

El método de preparación comprende la disolución o suspensión de la cantidad prescrita de procaína (de 0,5% a 5,0%, preferentemente 2,0% del peso total) en agua destilada estéril o solución salina fisiológica, agregando, por agitación, el agente de suspensión (0,2% a 5,0%, preferentemente 0,5% a 2,5%, del peso total) y luego introducir, mezclando, los cristales de penicilina-procaína G. A continuación se ajusta el volumen por la adición de la cantidad de agua requerida para llevar la concentración de ingredientes a los valores adecuados. La mezcla se realiza en condiciones estériles y todos los sólidos que se introducen han de estar finamente divididos, e incluso mejor

³²⁴ AHOEPM, patente 198.106; la memoria descriptiva consta de once páginas, mecanografiadas por una sola de sus caras, queda firmada en Madrid, a 31 de mayo de 1951. La empresa solicitante figura establecida en Thompson Road, Syracuse (Nueva York. EE. UU.). La patente española fue concedida el 1-VI-1951 y publicada el 1-VII-1951.

³²⁵ De la vinculación del norteamericano Frank Harold Buckwalter con *Bristol Laboratories Inc.* queda constancia, en la Administración norteamericana, entre enero de 1953 y agosto de 1954 [www.google.com/patents/].

³²⁶ En la memoria se señalan: fenol, cresol, metil-parabén (éster etílico del ácido p-hidroxibenzoico) y propil-parabén (éster propílico del ácido p-hidroxibenzoico).

³²⁷ En cualquier caso, la cantidad total empleada no debe superar el 10% por peso, y preferentemente no más del 5% del peso de la composición total.

³²⁸ Ejemplos de dichos ingredientes son: lecitina, colesterol, ‘Span 20’, ‘Span 40’, ‘Span 60’, ‘Span 80’, urea y para-amino-benzoato sódico.

pulverizados, el tamaño del polvo estará comprendido entre 80 y 50 micras de diámetro³²⁹.

Unos meses después, el 25 de octubre de 1951, esta misma empresa norteamericana, *Bristol Laboratories Inc.*, presentó a registro la solicitud de un certificado de adición a esta patente, por “Mejoras introducidas en el objeto de la patente de invención num. 198.106 para ‘procedimiento para obtener una suspensión acuosa de penicilina-procaína G’”³³⁰. El autor, por nuevos ensayos, ha averiguado que la cantidad de procaína que se puede disolver o suspender en la suspensión acuosa de penicilina-procaína G puede ser sensiblemente superior a la indicada en la memoria de la patente principal; allí se indicaba de 0,5% a 5,0%, mientras ahora se eleva este umbral hasta un 10,0%.

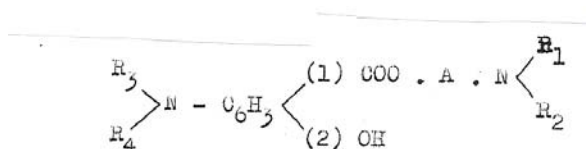
El 29 de octubre de 1951, la empresa alemana *Gewerkschaft Rheinpreussen*, presentó a registro un expediente para proteger una invención, por veinte años, relativa a un “Procedimiento para la obtención de combinaciones de penicilina difícilmente solubles, cristalizadas u oleosas”³³¹. Los autores parten de las experiencias de Charles J. Salivar, F. Howard Hedger y Ellis V. Brown, relativas a la obtención de sales penicilínicas de la novocaína (procaína), por medio de la reacción de procaína clorhídrica con la sal sódica de benzil-penicilina o de n-amil-penicilina en disolución acuosa³³². Estas combinaciones presentan, además de sus propiedades anestésicas, una acción prolongada o retardada de la penicilina. Pero si la procaína es sustituida por ésteres amino-salicílicos de alcoholes amínicos que tienen la siguiente fórmula general:

³²⁹ El autor propone media docena de ejemplos, muy similares entre si, de los que comentamos el primero: en condiciones estériles, se disuelven 2.0 partes de hidro-cloruro de procaína en agua destilada; se agregan, con agitación, 2.0 partes de carboxi-metil-celulosa sódica; a continuación se agregan 5 partes de penicilina-procaína G, que tienen una actividad de 6.000.0000 U.I., agitando durante algunos minutos; con posterioridad se adiciona agua para completar cien partes. La solución obtenida se envasa en botellas esterilizadas y se almacena. La suspensión contiene, aproximadamente, 300.000 U.I./ml.; es estable durante períodos superiores a un año a temperaturas inferiores a 30° C y, al se inyectada, da niveles sanguíneos de mayor eficacia frente a las conocidas suspensiones de penicilina-procaína G.

³³⁰ AHOEPM, patente 200.134; la memoria descriptiva consta de trece páginas mecanografiadas por una sola de sus caras, está firmada en Madrid a 25 de octubre de 1951; en ella se repite el texto del expediente AHOEPM, patente 198.106, sobre la que se solicita el certificado de adición. La empresa solicitante figura establecida en Thompson Road, Syracuse (Nueva York. EE. UU.); la autoría del procedimiento es asignada al norteamericano Frank Harold Buckwalter. El certificado de adición fue concedida con anterioridad al 16-IX-1953, fecha en que fue publicado.

³³¹ AHOEPM, patente 200.204; la memoria descriptiva consta de nueve hojas, escritas a máquina por una sola cara, y está fechada en 29 de octubre de 1951. La empresa figura domiciliada en Homburg/Niederrhein (Alemania). La patente española fue concedida el 5-XI-1951 y publicada el 16-XII-1951.

³³² Charles J. SALIVAR, F. Howard HEDGER, Ellis V. BROWN. “Crystalline procaine penicillins”. *Journal of the American Chemical Society*, 70(3): 1287-1288. Washington DC, 1948.

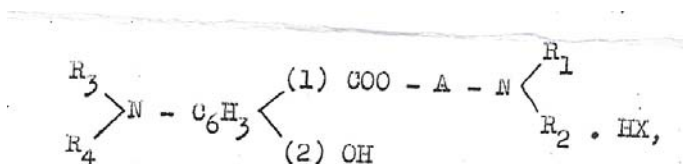


R_1 , R_2 , R_3 y R_4 representan átomos de hidrógeno o grupos alquilo, arilo, aralquilo o alquilarilo que pueden tener hasta diez átomos de carbono.

Los grupos $N-(R_1)$ y R_2 se corresponden con un anillo heterocíclico, por ejemplo un anillo piperidínico.

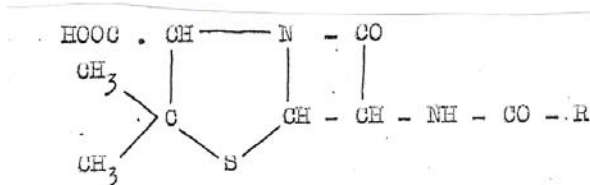
A representa una cadena de dos a doce grupos metilénicos, que puede ser lineal o ramificada.

se puede formar, por reacción con una penicilina, combinaciones penicilínicas de fórmula general:



HX representa cualquier penicilina en forma ácida.

Como ejemplos de ácidos amino-salicílicos se pueden citar el ácido 4-amino-2-oxi-benzoico, ácido 5-amino-2-oxi-benzoico y ácido 4-n-butil-amino-2-oxi-benzoico, así como otros ácidos amino-salicílicos isómeros. Entre los amino-alcoholes empleados para la esterificación figuran beta-dietil-amino-etanol, gamma-isobutil-amino-n-propanol, beta-fenil-amino-etanol y beta-piperidín-etanol. Estos ésteres de los ácidos amino-salicílicos y amino-alcoholes, tanto en forma de sus bases o en forma de sus sales con ácidos inorgánicos u orgánicos, constituyen uno de los componentes de la reacción en la que intervienen, bien con sales de penicilina bien con ácidos penicilínicos libres. Como componente penicilínico puede emplearse cualquier penicilina de fórmula general:



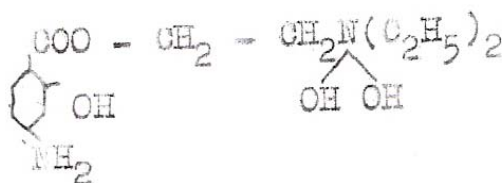
R representa un radical orgánico:

- en la penicilina G: $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ [bencilo].
- en la penicilina F: $-\text{CH}-\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ [pentilo].
- en la dihidro-penicilina F: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ [n-amilo].
- en la penicilina K: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ [n-heptilo].

Para obtener las nuevas combinaciones de penicilina se hace reaccionar una sal de los citados ésteres de ácidos amino-salicílicos en agua, o en un disolvente orgánico, con una sal de penicilina. Se separa así una nueva sal de penicilina que es difícilmente soluble o insoluble. Las combinaciones de penicilina obtenidas en parte son cristalinas, en parte oleosas.

También se pueden lograr nuevas combinaciones de penicilina haciendo reaccionar el éster del ácido amino-salicílico como base libre con una penicilina en forma ácida, en un disolvente adecuado. En este caso es conveniente emplear los ésteres del ácido amino-salicílico en cantidad, por lo menos, equimolar; es posible que en lugar de un éster único amino-salicílico o de penicilina única se hagan reaccionar mezclas de estas sustancias.

En lugar de estos ésteres de ácidos amino-salicílicos se puede emplear, en forma de bases libres o de sus sales, sus N-óxidos o N-oxi-hidratos, en los cuales el nitrógeno unido alifáticamente se transforma en óxido, como por ejemplo N-oxi-hidrato del éster di-etil-amino-etílico del ácido 4-amino-salicílico, de fórmula:



Son adecuados como medios disolventes: agua, hidrocarburos como hexano y benzol, hidrocarburos halogenados (cloroformo), cloruro de butilo secundario, alcoholes como etanol e isopropanol, ésteres como acetato de etilo y de butilo, éteres como dietílico e isopropílico, cetonas como acetona y butanona, o mezcla de estas sustancias.

Las nuevas combinaciones de penicilina obtenidas según este procedimiento se distinguen, en opinión de sus autores, por su buena tolerancia y su elevado poder anestésico; esta buena tolerancia está unida a un elevado efecto de depósito de la penicilina, por lo tanto son particularmente valiosas. Presentan, en parte, una difícil solubilidad, lo que permite que estas combinaciones se puedan obtener en disoluciones de penicilinas o de sus sales de inferior concentración y/o de menor pureza, con un buen rendimiento y con utilidad terapéutica, pudiendo prescindirse de una serie de fases de enriquecimiento y de purificación, hasta entonces [1951] habituales en la fabricación de la penicilina³³³.

Con fecha de 22 de julio de 1953, la empresa alemana *Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft* vormalis *Meister Lucius & Brünig* presentó, ante el registro español, una patente de invención, por 20 años, destinada a proteger un "Procedimiento para la obtención de preparados de penicilina secados por congelación"³³⁴; el procedimiento fue firmado por los alemanes Heinz Oeppinger, Dietmar Gericke y Ludwig Schornig.

Los autores mantienen que los preparados de penicilina para suspensiones fluidas, preferentemente de procaína-penicilina, pueden obtenerse cuando se someten a desecación por congelación las suspensiones de sales de penicilina con un contenido de un antisuero, una vacuna o una sustancia con propiedades antigénicas no específicas. Si se congela una suspensión acuosa de una sal de penicilina poco soluble, dado el caso después de agregar una sustancia inmunizadora, y se elimina el agua por secado a baja temperatura y con buen vacío, al agregar al residuo seco la cantidad de agua cedida en el secado, se obtiene una dispersión más fluida que lo era la primitiva. Además, el polvo seco puede dispersarse nuevamente en una dispersión en agua, fácilmente y sin formación de grumos.

³³³ Los autores ilustran este procedimiento con una serie de ejemplos prácticos, nueve en total, de los que reseñamos el primero: a una disolución formada por 4,57 g. de penicilina G sódica en 45 cm³ de agua se le añade una disolución clorhídrica de 3,7 g. del éster beta-dietil-amino-etílico del ácido 2-oxi-4-amino-benzoico en 20 cm³ de agua. La mezcla resultante se lleva a una temperatura de 5° C; al poco tiempo comienza la cristalización de la sal de penicilina G del éster beta-dietil-amino-etílico del ácido 2-oxi-4-oxi-amino-benzoico. El producto que se obtiene es de un color blanco; se filtra, se lava con agua y se seca; su solubilidad en agua, a la temperatura ambiente, es del 0,75%; análisis de C₂₉H₃₈O₇N₄S: N 9,55% (calculado), 9,37% (hallado), S 5,46% (calculado), 5,78% (hallado).

³³⁴ AHOEPM, patente 210.533; la memoria descriptiva consta de doce hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; como domicilio de la empresa figura Frankfurt (M)-Hoechst (Alemania). La memoria, basada en el expediente alemán 9.592/52, fechado el 28 de julio de 1952, sobre el que se hace constar la prioridad, fue presentada, en Madrid, el 22 de julio de 1954; concedida el 26 de octubre de 1954 y publicada el 1 de diciembre de éste 1954.

Las suspensiones de penicilina pueden, antes del secado por congelación, contener las más diversas sustancias inmunizadoras, por ejemplo antisueros contra los bacilos del grupo de la salmonella, estafilococos o microbios anaerobios y también vacunas u otras sustancias con propiedades antigénicas. Las sustancias en las suspensiones de penicilina no sufren alteración por la sal de penicilina durante el secado por congelación. La acción inmunizadora del suero y de otras sustancias se conserva totalmente. Para nada influye la relación de la penicilina y de la sustancia inmunizadora.

El ensayo sobre la adecuada aplicación de una suspensión se realiza del modo más sencillo: tomándola e inyectándola por medio de una aguja. De dos suspensiones es mejor aquella que puede inyectarse por una aguja más fina.

Según los autores, se aprecia de modo más claro el influjo del secado por congelación, sobre la capacidad de fluidez de la suspensión, cuando esta última se examina en un viscosímetro rotatorio provisto de un dispositivo registrador automático. Después del secado por congelación, el residuo se tamiza preferentemente en un tamiz grueso, con objeto de obtener un polvo uniforme, que puede almacenarse y conservarse largo tiempo. Con el polvo se puede, agregándole la cantidad de agua eliminada en el secado, preparar de nuevo una suspensión y emplear ésta; la adición de agua se efectúa inmediatamente antes del empleo de la inyección. La suspensión, después de incorporar el agua, debe agitarse brevemente y tomarse con una aguja fina. El medicamento preparado según este procedimiento puede contener las sustancias en un volumen considerablemente mayor que el necesario de suero; frecuentemente basta el que el preparado de la penicilina de acción prolongada hubiera tenido, sin la adición de la sustancia inmunizadora. Los autores proponen nueve ejemplos prácticos relacionados con este procedimiento³³⁵.

2.2.4.b. Tamaños de partículas

El 22 de febrero de 1949, la entidad norteamericana *Bristol Laboratories Inc.* presenta en el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, “Un método de preparar un producto inyectable de penicilina”³³⁶.

Hasta los años finales de la década de 1940 se recomendaba el uso de partículas de gran tamaño (50 micrones o más) para su incorporación a varios vehículos a fin de obtener niveles terapéuticos en la sangre que perdurasen mucho tiempo³³⁷; los

³³⁵ Describimos el primero de ellos: para la elaboración del líquido de la suspensión se disuelven, en agua, 10 g. de polivinil-pirrolidón, 1 g. de éster metílico del ácido p-oxi-benzoico y 15 g. de citrato sódico anhidro; la solución se completa con agua, hasta un volumen de 500 ml., el pH se ajusta a 7,02 mediante 100 mg. de ácido cítrico y se esteriliza al vapor; después de la esterilización, la viscosidad es de 1,8 cP (centi poises) y el pH es de 6,8. Una cantidad de 11 ml. del líquido anterior se mezcla con suspensiones con 300.000 U.I. de penicilina con antisuero de typhus abd., 4,85 g. de sal de procaína de penicilina con 1% de adición de lecitina y 14,5 ml. de antisuero de typhus abd. de conejo. La suspensión se seca por congelación; el residuo es de 6,6 g.; se obtiene una granulación uniforme por tamizado. Una cantidad de 0,46 g. del polvo contiene 330.000 U.I. de penicilina y las sustancias activas de 1 ml. de suero de conejo. La cantidad de agua calculada por la pérdida del secado, para 0,46 g. de polvo, es de 0,67 ml.

³³⁶ AHOEPM, patente 187.163; la memoria descriptiva consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 22 de febrero de 1949. La empresa tiene su domicilio social en Chimes Building, Syracuse (Nueva York. EE. UU.); esta solicitud se corresponde a la presentada, en los Estados Unidos de América, el 7 de abril de 1948. La patente española fue concedida el 20 de abril de 1949 y publicada el 16 de junio de 1949.

³³⁷ Cf. Velma L. CHANDLER, Monroe J. ROMANSKY, Henry WELCH, Jay A. ROBINSON, William W. ZELLER, Harry F. DOWLING, Harold L. HIRSH. “A method for determining the size and relative weight

investigadores de *Bristol Laboratories Inc.* demostraron experimentalmente lo contrario: aquellos vehículos que contienen partículas de sales de penicilina con un tamaño de menos 50 micrones producen niveles terapéuticos en la sangre mucho más prolongados que los que obtenido hasta entonces. Reconocen no saber, con certeza, el mecanismo de la mejora obtenida, opinan que puede ser debido a una protección más efectiva de las sales de penicilina frente a la acción de los fluidos de los tejidos.

Los productos de penicilina reseñados en esta patente se preparan reduciendo el tamaño de partícula de la sal de penicilina que se incorpora dentro del vehículo a administrar. Emplean varios métodos para ello: por ejemplo, en los cristales de penicilina G-procaína se ha reducido el tamaño de sus partículas por medio de una unidad micronizadora; a los mismos resultados se llega usando un fluidificador, un pulverizador, un pulverizador de impacto, un pulverizador de chorro, un molino de martillos o un molino de bolas. El tamaño de las partículas también puede controlarse regulando las condiciones de cristalización.

Los autores ya dejaron indicado que, cuando el tamaño de las partículas es de 50 micrones o menos, los resultados obtenidos son satisfactorios, pero sus datos experimentales les llevan a señalar que es preferible emplear sales de procaína-penicilina G con un tamaño de partículas de 0,1 a 10 micrones. El efecto del tamaño de las partículas sobre la prolongación de los niveles en la sangre, se presentan en la figura 1³³⁸; antes de la inyección se obtuvieron muestras de control de la sangre, los pacientes recibieron luego 300.000 U.I. de penicilina y se tomaron nuevas muestras de sangre a los intervalos indicados.

of penicillin particles and its importance in preparing adequate preparations of liquid penicillin in oil and wax". *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 37(1): 21-23. Washington DC, 1948.

³³⁸ La figura se acompaña de una tabla de datos justificativos, en los que se indican: tiempo en horas después de la administración, número de pacientes, niveles medios en la sangre y porcentajes de pacientes con niveles en la sangre de 0,03 unidades de penicilina o más.

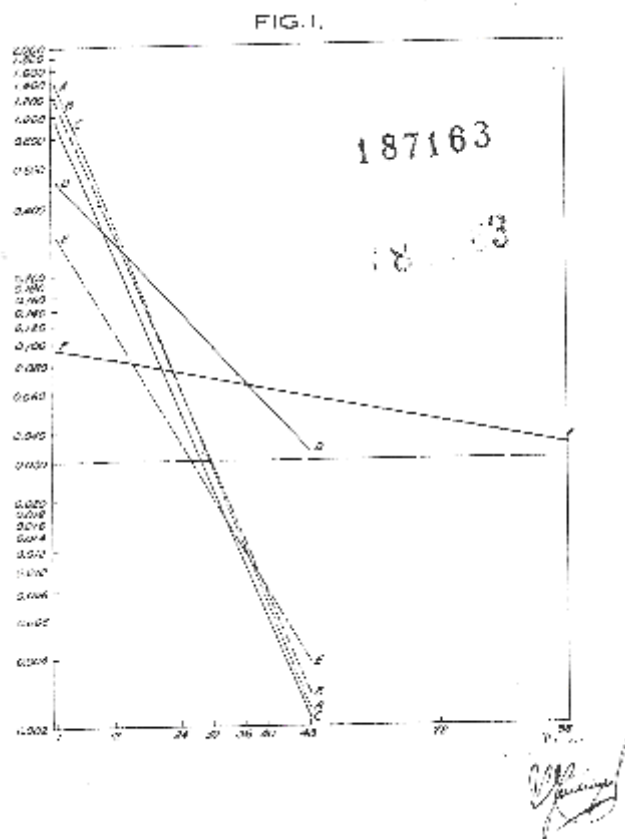


Figura 1. Concentraciones medias de penicilina en la sangre producidas por inyecciones únicas (300.000 U.I. cada una) de seis preparados repositorios de penicilina.

- A. Penicilina G sódica en aceite de cacahuete con 4,8% (p/v) de cera blanca de abejas.
- B. Penicilina G sódica en aceite de cacahuete con 2% (p/v) de monoestearato de aluminio.
- C. Penicilina G procaínica en aceite.
- D. Penicilina G procaínica en aceite de cacahuete con 2% (p/v) de monoestearato de aluminio (partícula grande).
- E. Penicilina G alumínica en aceite de cacahuete con 2% (p/v) de monoestearato de aluminio.
- F. Penicilina G procaínica en aceite de cacahuete con 2% (p/v) de monoestearato de aluminio (partícula pequeña).

Las abscisas representan horas de tiempo después de la administración; las ordenadas unidades de penicilina por centímetro cúbico de suero. La raya horizontal de trazos, al nivel de 0,030 unidades, representa la concentración efectiva mínima teórica (AHOEPM, patente 187.163).

En la memoria se presentan, también, los resultados obtenidos en conejos cuando el tamaño de partícula se reduce desde 250 micrones a 1-2 micrones. Los estudios presentados fueron descritos con referencia a cristales de penicilina G-procaína, pero también se incluyen en él cristales de otras sales de penicilina: potásica, cálcica y otras amínicas, tales como la sódica.

Como conclusión se obtiene que los tamaños de partículas reducidas (50-0,2 micrones) de cualquier sal de penicilina, en vehículos que no sean aceites gelificados³³⁹, originan prolongados niveles terapéuticos de penicilina en la sangre.

³³⁹ Estos vehículos comprenden dispersiones acuosas en que las partículas de penicilina son recubiertas con gomas, plásticos, resinas, jabones metálicos, aceites, grasas, ceras o recubrimientos inorgánicos, tales como óxidos.

FIG. 2.

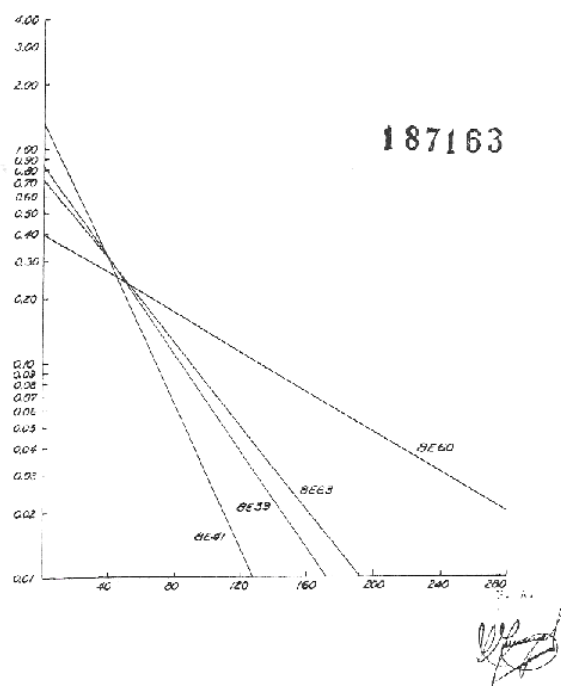


Figura 2. Las abcisas representan horas y las ordenadas unidades de penicilina por centímetro cúbico en la sangre (AHOEPM, patente 187.163).

El 27 de marzo de 1951 la empresa norteamericana *Merck & Co. Inc.* presentó ante el registro español de patentes una solicitud para proteger, por veinte años, “Un procedimiento de preparar cristales de procaína-bencil-penicilina”³⁴⁰, especialmente diseñado para su uso en suspensiones parenterales.

Este procedimiento presenta el modo de fabricar nuevos cristales de procaína-bencil-penicilina que tienen forma poliédrica o de platillo, adaptadas para moverse por la aguja de la jeringa. La forma de crecimiento cristalino de la procaína-bencil-penicilina se modifica por completo cuando la reacción entre procaína y bencil-penicilina se realiza en presencia de un éter de celulosa soluble en agua, como metil-celulosa³⁴¹.

La forma de platillos de los cristales de procaína-bencil-penicilina tiene una estructura totalmente diferente de los cristales en forma de aguja, los habituales cuando se obtiene procaína-bencil-penicilina por los medios hasta entonces conocidos; la longitud y la anchura de forma en platillo son del mismo orden, pero la longitud en la forma de aguja es de 3 a 6 veces mayor que la anchura.

³⁴⁰ AHOEPM, patente 197.156; la memoria descriptiva, de nueve hojas, escritas por una sola de sus caras, queda firmada en Madrid, a 27 de marzo de 1951. Esta solicitud se corresponde con la presentada en los Estados Unidos de América el 31 de marzo de 1950, bajo el número 153.244/1950. La entidad solicitante figura como establecida en 126 East Lincoln Avenue, Rahway (New Jersey. EE. UU.). La patente española fue concedida el 4-III-1953 y publicada el 1-IV-1953.

³⁴¹ La cantidad de metil-celulosa necesaria para la preparación de la nueva forma cristalina de procaína-bencil-penicilina es pequeña, pero conviene emplear metil-celulosa en una concentración mayor de 0,05%. Si la concentración es más baja del valor indicado se obtiene una mezcla de cristales que contienen la forma de agujas y la forma poliédrica roma. Cuando se utilizan concentraciones superiores al 0,05 %, la procaína-bencil-penicilina resultante se recupera siempre en forma de platillos, muy adecuada para el uso en suspensiones parenterales.

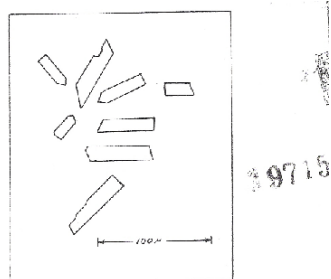


Fig. 1

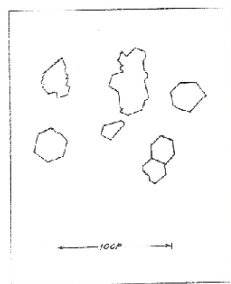


Fig. 2

Comparación entre las formas cristalinas de procaína-bencil-penicilina.

Figura 1. Forma de aguja.

Figura 2. Forma de platillos.

(AHOEPM, patente 197.156).

La reacción se realiza disolviendo, primero, una sal de bencil-penicilina en una solución acuosa de metil-celulosa; a continuación, una solución de una sal de procaína en metil-celulosa se añade a la solución del bencil-penicilato y la mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente³⁴². Al cabo de poco tiempo, la procaína-bencil-penicilina cristaliza en forma de diminutos platillos planos; se recuperan los cristales y se purifican por lavado, según los procedimientos ordinarios³⁴³.

2.2.4.c. Recubrimiento de pepsina: 'picos' de penicilina

El 18 de noviembre de 1949, la empresa norteamericana *American Cyanamid Company* presentó, ante el registro español, una solicitud para proteger, mediante una patente de invención por veinte años, "Un método de producir una composición de penicilina revestida"³⁴⁴.

Las concentraciones de penicilina en sangre, después de una inyección de penicilina procaínica en aceite que contiene mono-estearato de aluminio, aunque el

³⁴² Las sales de procaína más adecuadas para esta reacción son las solubles en agua, como por ejemplo el hidrocloreto de procaína. En cuanto a las sales de bencil-penicilina que pueden usarse para esta reacción figuran bencil-penicilina sódica, N-etil-piperidina-bencil-penicilina y otras análogas.

³⁴³ Los autores proponen media decena de ejemplos, muy similares entre sí; comentamos el primero de ellos: a una solución formada por 27,3 g. (0,1 mol) de hidrocloreto de procaína en 500 ml. de metil-celulosa acuosa al 1%, se añadió una solución de 33,6 g. (0,1 mol) de bencil-penicilinato sódico en 500 ml. de metil-celulosa acuosa al 1%, agitando constantemente a la temperatura ordinaria; al cabo de unos pocos minutos, el bencil-penicilinato de procaína cristalizó en forma de diminutos platillos planos, que fueron recuperados por filtración, lavado y desecación; estos cristales se mezclaron con penicilina neutralizada y sodio. Se ensayaron inyectándoselos a conejos; se realizaron 29 ensayos y en ninguno de ellos se observó bloqueo. Se hizo un experimento de control comparativo, usando una fórmula que contenía la forma acicular; hubo bloqueo en 16 ensayos de los 62 realizados.

³⁴⁴ AHOEPM, 190.471; la memoria descriptiva consta de once hojas, escritas a máquina por una sola cara y firmada en Madrid a 18 de noviembre de 1949; como domicilio social de la empresa figura el número 30 de Rockefeller Place, Nueva York (EE. UU.). Esta solicitud se corresponde a la presentada en Estados Unidos de América en marzo de 1949, bajo el registro 79.624/49. La patente española fue concedida el 19-XI-1949 y publicada el 16-I-1950.

mantenimiento es relativamente prolongado, ha dado como resultado una concentración 'pico' relativamente baja³⁴⁵; esta baja concentración 'pico' no es satisfactoria en el tratamiento de enfermedades agudas.

La acción prolongada del preparado de penicilina procaínica que contiene mono-estearato de aluminio depende de dos factores:

1º. La insolubilidad de la penicilina procaínica.

2º. El efecto protector contra la disolución en cuerpos fluidos resultantes de la presencia del mismo mono-estearato de aluminio; no en vano el mono-estearato de aluminio es una sustancia hidrófoba y su repulsión del agua retrasa la disolución de la penicilina procaínica y su absorción.

La adición al preparado de penicilina procaínica con mono-estearato de aluminio de penicilina potásica o de penicilina sódica cristalizadas, ambas muy solubles, puede parecer un método satisfactorio para aumentar las concentraciones 'pico'; pero el mono-estearato de aluminio no sólo protege a la penicilina procaínica de la rápida absorción por los fluidos de los tejidos, sino que también protege a cualquier otra penicilina añadida al preparado³⁴⁶.

La inyección de penicilina sódica o potásica cristalizada seca en aceite, que contiene cantidades grandes de pectina, da como resultado una prolongación de la actividad de la penicilina en el cuerpo; además, la concentración de pectina es importante, dentro de ciertas escalas, para obtener un producto eficaz; cuando la concentración de pectina es relativamente baja (*ca.* 60 mg. o menos por mililitro de aceite), no se obtiene una prolongación en la acción de la penicilina.

La pectina es un agente hidrófilo; cuando la penicilina en aceite con pectina se inyecta en el cuerpo humano, la pectina atrae y retira agua de los tejidos, formando un gel, y protege a la penicilina contra la rápida absorción por los fluidos del tejido.

Como el mono-estearato de aluminio es una sustancia hidrófoba y la pectina es una sustancia hidrófila, pareció posible utilizar ambos en un producto que daría niveles de 'pico' relativamente altos de penicilina en el cuerpo. Por supuesto, tal producto no podría contener pectina suficiente para formar un gel ya que, si la contuviera, el resultado sería un marcado efecto de prolongación; pero si se utilizan cantidades pequeñas de pectina, los efectos de prolongación no se obtendrían o serían mínimos y, sin embargo, la fuerte afinidad de la pectina por el agua atraería el agua a la penicilina soluble y se produciría su disolución. Por lo tanto, este procedimiento trata de recubrir sales cristalizadas de penicilina con una capa muy delgada de pectina.

El procedimiento consiste en desarrollar un método para producir una composición de penicilina revestida, que comprende una solución de una sal de penicilina y pectina en una pequeña cantidad de agua, coprecipitar la sal de penicilina y la pectina por adición de acetona y recuperar de ella la sal de penicilina cristalizada

³⁴⁵ Los autores definen la concentración 'pico', como el máximo de penicilina que puede obtenerse en sangre después de la inyección. Normalmente, después de una inyección de 300.000 U.I. de penicilina se alcanza un valor medio de 0,13 U.I./ml.

³⁴⁶ Mediante un ensayo real se comprobó que la adición de 50.000 U.I. de penicilina cristalizada (potásica o sódica), al preparado normal de estearato, aumenta algo el nivel 'pico', al orden de 0,5 U.I./ml. de suero. Esta concentración en sangre es muy baja si se compara con la producida por la inyección de 50.000 U.I. de penicilina cristalizada sola, que da como resultado una concentración 'pico' de penicilina en sangre próxima a 2 U.I./ml.

recubierta de pectina. La penicilina recubierta de pectina puede luego añadirse a una penicilina-procaína en aceite que contenga mono-estearato de aluminio³⁴⁷.

La penicilina cristalizada recubierta de pectina tiene capacidad para aumentar las concentraciones 'pico' de penicilina en el cuerpo, además de presentar otras ventajas: si la penicilina cristalizada no recubierta de pectina se añade al preparado de penicilina procaínica en aceite y mono-estearato de aluminio, la mezcla tiende a pegarse a la jeringuillas cuando se intenta sacarla de la ampolla³⁴⁸; cuando la penicilina potásica se

³⁴⁷ Los autores, a fin de que su procedimiento pueda comprenderse plenamente, lo describen con referencia al ejemplo que a continuación se expone: una cantidad de 10 g. de penicilina potásica (cristalizada) se disuelve en 32 ml. de una solución al 1% de pectina (0,32 g.); cuando ya se han disuelto, la solución de penicilina y pectina se coloca en un mezclador cuyas paletas giran a pequeña velocidad; se añaden rápidamente *ca.* 750 ml. de acetona, con un contenido de humedad del 0,5% o menos. La velocidad del mezclador se aumenta hasta su valor máximo cuando los cristales comienzan a formarse y se deja girar durante 30-60 segundos. Los cristales se recogen sobre papel por filtración al vacío y se lavan inmediatamente cuatro veces con acetona pura; así se consigue separar el agua residual lo más rápidamente posible e impedir una nueva disolución del material. La torta del filtro se seca en el vacío a 30°-90° C durante cuatro horas y se desmenuza en un polvo fino, haciéndola girar unos pocos minutos en un molino de bolas o en un triturador. A continuación se recoge, se esteriliza al calor y se conserva en un frasco herméticamente tapado. La penicilina potásica revestida consiste, microscópicamente, en largas y finas agujas. Este proceso utiliza, aproximadamente, 1 mg. de pectina por cada 30 mg. (50.000 U.I.) de penicilina. La adición de acetona a la solución acuosa de penicilina y pectina da como resultado una coprecipitación de penicilina y pectina: la pectina precipita de la solución en partículas de aproximadamente una micra o menos y la penicilina potásica en forma de largas y finas agujas que se recubren con la pectina del tamaño de una micra. Es esencial, para obtener una precipitación eficaz de la penicilina y la pectina, que la precipitación sea prácticamente simultánea; un retraso en la precipitación de la penicilina, a causa de un exceso de agua en la acetona, da como resultado un producto que no es eficaz para determinar la rápida disolución de la penicilina al inyectarla en el organismo.

Se prepararon dos tandas de acuerdo con el procedimiento señalado, se combinaron y molieron para dar un preparado uniforme; el ensayo yodométrico de la sal potásica original y de la sal revestida fueron idénticos. Un volumen de 700 ml. de penicilina que contenía mono-estearato de aluminio en aceite, se dividió en cinco porciones iguales; una porción se guardó como control; con las cuatro restantes se prepararon cuatro muestras experimentales añadiendo a la correspondiente porción la cantidad del producto que se indica a continuación:

- Porción a: se le adicionaron 4,75 g. de penicilina potásica para dar 50.000 U.I./ ml. de penicilina cristalizada añadida; sin pectina.
- Porción b: se le adicionaron 4,75 g. de penicilina potásica cristalizada revestida con pectina.
- Porción c: se le adicionaron 9,5 g. de penicilina potásica para dar 10.000 U.I./ml. de penicilina cristalizada añadida; sin pectina.
- Porción d: se le adicionaron 9,5 g. de penicilina potásica cristalizada revestida con pectina.

La penicilina potásica cristalizada era la misma sal que la empleada al hacer el producto revestido con pectina. Los valores de ensayo del producto acabado fueron un 94% del calculado para la sal coprecipitada y de un 95% del valor calculado para la sal potásica cristalizada. Se hicieron experimentos con 25 voluntarios: de ellos 13 recibieron penicilina procaínica en aceite con monoestearato de aluminio, que contenía la sal revestida con pectina; los otros 12 recibieron la penicilina procaína en aceite que contenía la sal no revestida. A los voluntarios se les extrajo sangre al cabo de una, dos y tres horas de haber recibido la dosis del producto y se determinó el nivel de penicilina en el suero. Los datos obtenidos permiten deducir que, con la penicilina procaínica en aceite con mono-estearato de aluminio al cual se ha añadido penicilina potásica revestida de pectina en una concentración de 50.000 unidades, se obtienen niveles en la sangre que son tres o más veces más altos que los obtenidos con un preparado que contenía 50.000 unidades de penicilina potásica no revestida.

³⁴⁸ En uno de los experimentos realizados para determinar los efectos de la penicilina procaínica en aceite de mono-estearato de aluminio que contiene penicilina potásica revestida y no revestida de pectina, se observó que, al llenar las jeringuillas con estos productos antes de la inyección, el practicante que llenó con el producto recubierto con pectina cargó trece jeringuillas, mientras que el que trabajaba con penicilina potásica cristalizada no recubierta con el preparado de mono-estearato de aluminio estaba llenando cuatro. Por otra parte, cuando la penicilina procaínica en aceite que contiene mono-estearato de aluminio al cual se han añadido 100.000 unidades de penicilina potásica cristalizada no revestida con

recubre de una delgada capa de pectina, sus propiedades físicas cambian marcadamente. La penicilina potásica tiende a formar ‘tortas’ en un recipiente, cuando ésta se golpea ligera y secamente sobre una superficie; cuando la penicilina recubierta se trata de la misma forma, la formación de ‘tortas’ no ocurre. El uso de la penicilina recubierta para su administración por inhalador es posible. Las características de la penicilina recubierta de pectina son de valor considerable en los trabajos de llenado de ampollas con las maquinas correspondientes, pues no hay tendencia al aglomeramiento, cosa que sí ocurre con la penicilina potásica, dando como resultado una carga inexacta en las ampollas.

2.2.4.d. Adición de fitinatos

El 24 de septiembre de 1955, la empresa norteamericana *Bristol Laboratories Inc.* solicitó protección para una patente relativa a “Un procedimiento para mejorar la facilidad de nueva suspensión de suspensiones acuosas de penicilina”³⁴⁹. Este procedimiento se refiere a suspensiones acuosas de penicilina que contienen ácidos inosito-fosfóricos [*sic* por hexa-inisitol-fósforico (ácido fítico)] o sales inocuas de los mismos.

Hasta los años centrales de la década de 1950, el único método disponible para obtener preparados de penicilina que, al guardarlos, no sedimentaran ni formasen grumos y pudieran fácilmente ser llevados nuevamente al estado de suspensión completa, era la agitación manual. Los autores proponen un medio inocuo y barato para asegurar que, con una breve agitación manual, se consiga un estado de dispersión completa y uniforme de estas suspensiones acuosas de sales insolubles de penicilina, incluso después de un almacenaje prolongado. Proponen para ello la incorporación a las sales acuosolubles de penicilina de un compuesto del grupo de los ácidos fíticos, particularmente el fitinato sódico, en proporciones de 0,1%-0,2%³⁵⁰. A la fórmula pueden añadirse otros ingredientes que mejoren los niveles en sangre de la penicilina, las propiedades de manejo y su estabilidad, tales como lecitina, colestestina, ‘Span 20’, ‘Span 40’, ‘Span 60’, ‘Span 80’, ‘Tween 20’, ‘Tween 40’, ‘Tween 60’, ‘Tween 80’, ‘Tween 85’, urea o p-amino-benzoato sódico.

pectina se inyectó a varios pacientes, fue necesario usar mas de un lugar de inyección a causa de la dificultad que presentaba este preparado a ser inyectado; pero estas dificultades no se presentan cuando la penicilina potásica revestida con pectina se utilizó al nivel de 100.000 unidades en la procaina en aceite conteniendo mono-estearato de aluminio. Es decir, el uso de penicilina potásica revestida de pectina en el producto de mono-estearato de aluminio mejora la aptitud del producto para ser inyectado.

³⁴⁹ AHOEPM, patente 224.139; la memoria descriptiva consta de 19 hojas escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 24-IX-1955. La empresa tiene fijado su domicilio en Thompson Road, Syracuse (Nueva York. EE. UU.). La patente, de invención, fue presentada con anterioridad ante la Administración norteamericana, pero el documento no permite concretar la fecha. La patente española fue concedida el 2-XII-1955 y publicada el 1-II-1956.

³⁵⁰ Los autores proponen cinco ejemplos, comentamos el segundo de ellos: en condiciones estériles, 5 g. de citrato sódico anhidro, 0,5 g. de carboxi-metil-celulosa sódica y 0,35 g. de fitinato sódico se añadieron a 50 cm³ de agua y se agitaron hasta que la solución estuvo terminada. Un volumen de 25 cm³ de esta solución se echó en un recipiente de 100 cm³, en el cual también se adicionaron 16,5 g. de penicilina G procainica (potencia: 1.000 U.I./mg.), tamizada a través de un tamiz de 80 mallas. El volumen se elevó a 50 cm³ con la solución de citrato-carboxi-metil-celulosa-fitinato y la suspensión se mezcló a fondo; el pH de la solución se ajustó a 6,5 con ácido cítrico. La solución, al guardarla mucho tiempo a 37^a C, posee la posibilidad de dar, cuando convenga, una nueva suspensión y presentar un aspecto más saludable en comparación con un producto duplicado que carece de fitinato sódico.

2.2.4.e. Sales alcalinas de penicilinas procaínicas

Hasta los comienzos de la década de 1950, las sales de penicilina de aminas, por ejemplo la sal de trietil-amina, se transformaban en sales alcalinas de penicilinas disolviendo la sal de la amina en un disolvente orgánico, como podía ser el iso-propanol y otros alcoholes inferiores, también acetona y otros cetonas inferiores, y añadiendo luego a la solución de sal amínica una solución de una sal alcalina de un ácido orgánico, por ejemplo el acetato potásico. La sal amínica se convierte por reacción de metátesis en la sal de potasio (o de otro metal) de la penicilina. Normalmente la sal alcalina de la penicilina es menos soluble en las mezclas orgánicas que la sal amínica y, en consecuencia, precipita desde el disolvente y puede ser separada por filtración u otros medios.

Tal procedimiento no es aplicable a las sales procaínicas de penicilina, que son sustancias insolubles en agua y cetonas inferiores, cloroformo y otros alcanos que contienen halógeno, así como en otros disolventes orgánicos. Las penicilinas procaínicas son solubles en metanol caliente, pero en tal solución ocurre una descomposición de la sal, aproximadamente, de un 10% por hora.

El 7 de agosto de 1953, la empresa alemana *Chemie Grünenthal* Gesellschaft m.b.H. presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para que le fuera protegido, por veinte años, un “Procedimiento para la fabricación de nuevos ésteres de la serie penicilínica”³⁵¹. Los autores parten de la base de que los compuestos de fórmula general Pen-COO-R₁-N-(CH₃)₃-R₂ [donde Pen representa un radical penicilina, el resto -COO- el radical del grupo carboxílico de la molécula de penicilina, R₁ un radical alquilo³⁵² y R₂ un radical ácido], tienen la propiedad de acumularse en el hígado y en el sistema biliar. Las combinaciones complejas metálicas de los nuevos ésteres actúan de la misma forma que los ésteres de que proceden³⁵³; éstas tienen como fórmula general: Pen-COO-R₁-N(CH₃-Me)₃ ó Pen-COO-R₁-N(CH₃)₃ [Pen y R₁ tienen el significado antes mencionado, Me designa un resto metálico, tal como cinc, cobalto o hierro, o también un radical de un derivado metálico adecuado para la formación de las combinaciones complejas, tal como un elemento halogenoide].

Estas nuevas combinaciones pueden ser fabricadas por diferentes procedimientos. Uno de ellos, de carácter general, consiste en hacer reaccionar compuestos del tipo Pen-COO-R₁-N(CH₃)₃ con combinaciones de fórmula general CH₃-

³⁵¹ AHOEPM, patente 210.782; la memoria descriptiva, que consta de trece hojas mecanografiadas por una sola de sus caras, está firmada en Madrid, a 7 de agosto de 1953. La empresa está domiciliada en Stolegerg im Rheinland (Alemania). La patente española fue concedida el 10-IX-1953 y publicada el 16-X-1953.

³⁵² Este radical alquilo R₁ debe poseer una cadena con 1-5 átomos de carbono; preferentemente R₁ designa un radical etilo, pero también puede significar un radical ácido inorgánico, como un átomo de halógeno, o el grupo SO₄⁻, o un radical de un ácido orgánico, como ácido acético o ácido benzoico. Este radical puede designar, también, el de un ácido carbónico de la serie de penicilina; en este caso, los nuevos productos contendrían dos residuos de penicilina, de los cuales uno, del orden de éster, está unido al radical alquilo y el otro, del orden de sal, está unido al átomo de nitrógeno.

³⁵³ Los autores de la memoria remiten a los trabajos de FROMMEL et al. *Journal Suisse de Médecine* 77: 1269. Basilea, 1947 y FROMMEL. *Archives des Maladies du Cœur et des Vaisseaux*, 42: 246. París, 1949, y a la bibliografía que en ellos se menciona.

Z [en la cual Z designa el resto ácido, tal como un metilo de halogenuro, formando parte de una combinación cuaternaria]; para lograr dicho fin, se empleó un exceso de la combinación metilo; el proceso ocurre dejando en reposo la mezcla reactiva a la temperatura ambiente. Los productos iniciales de los ésteres dimetil-amino-alquilo de la serie de penicilina pueden ser obtenidos mediante los procedimientos ya conocidos para la formación de los ésteres de penicilina³⁵⁴. Los productos iniciales de las combinaciones de penicilina que se emplean en este procedimiento, como por ejemplo las combinaciones de fórmula general Pen-COO-CH₂-CH₂-Hal, se pueden obtener combinando una sal alcalina de penicilina con un di-halógeno-alcano, como por ejemplo 1,2-dibromo-etano (Br-CH₂-CH₂-Br) en presencia de dimetil-formamida, dimetil-acetamida o de cualquier otra amida ácida de bajo peso molar empleada como disolvente; se evita así el desagradable e insano trabajo con el dialquil-halogenuro.

Otro procedimiento para la fabricación de los nuevos ésteres, propuesto por los autores de esta patente, consiste en que una combinación de la serie de la penicilina, reactiva en el sentido de la formación de ésteres, se sustituye por una combinación de fórmula general: X-R₁-N(Z)-(CH₃)₃ [en la cual X designa una combinación de penicilina en el sentido de la formación de un grupo éster reactivo, R₁ un residuo alquilo y Z el radical de un ácido]. Como productos iniciales pueden emplearse, por ejemplo, sales alcalinas de la serie penicilina o anhídridos de la serie de penicilina que sean reactivos en el sentido de la formación de éster con los alquilo-halogenuros o los alcoholes de la fórmula anterior. Esos cambios se realizan en presencia de disolvente, tal como cetona exenta de agua, y empleando un exceso de la combinación alquilo³⁵⁵.

El 24 de octubre de 1955 la empresa norteamericana *Schenley Industries Inc.* presentó a registro una solicitud de patente para proteger, por veinte años, su invención sobre “Un procedimiento para la producción de una sal estéril de metal alcalino de una penicilina”³⁵⁶, a partir de penicilinas procaínicas no estériles.

³⁵⁴ Así, por ejemplo, una sal alcalina de la serie de penicilina podrá ser sustituida por un dimetil-amino-alquilo-halogenuro de fórmula Hal-R₁-N(CH₃)₂, por un anhídrido de la serie de la penicilina o por un dimetil-amino-alcánol de fórmula HO-R₁-N(CH₃)₂. Los autores remiten a un trabajo de Frederick H. CARPENTER. “The anhydride of benzylpenicillin”. *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2964-2966. Washington DC, 1948.

³⁵⁵ Los autores ilustran sus procedimientos con media docena de ejemplos; comentamos el primero de ellos: una cantidad de 12,3 g. de sodio penicilina G, en 175 cm³ de acetona, prácticamente exenta de agua, se hierven en 7,45 g. de dimetil-amino-etil-cloruro, durante 22 horas; se forma una precipitación muy fina y lechosa de cloruro de sodio, producida en forma creciente. La mezcla se enfría y se elimina el cloruro de sodio; se evapora en el vacío el filtrado, a temperatura ambiente, hasta un volumen de unos 25 cm³; se mezcla con 100 cm³ de éter de petróleo, se agita bien, se decanta separando el aceite amarillento que se ha formado. El aceite amarillento se lava dos veces con 50 cm³ de petróleo cada vez; el aceite libre de disolvente se mezcla con un ligero exceso de yoduro de metilo, agitando durante un cierto tiempo. La cantidad de aceite, conforme al procedimiento indicado, es del orden de 11,3 g. o sea un 83% del rendimiento teórico; con dicha cantidad se hacen reaccionar 4,5 g. de yoduro de metilo, el producto de reacción se calienta y cada vez es más viscoso. Se deja reposar 24 horas a la temperatura ambiente; aparece una masa pringosa, extensible en largos filamentos; mediante evaporación en el vacío del yoduro de metilo aparece una masa de color amarillo canario, cristalina e higroscópica, soluble en agua, la cual es el colin-éster deseado. El colin-éster tiene la siguiente fórmula general: Pen-COO-CH₂-CH₂-N(I)-(CH₃)₃.

³⁵⁶ AHOEPM, patente 224.622; la memoria descriptiva consta de dieciséis hojas escritas a máquina, por una sola cara, queda firmada en Madrid, a 24 de octubre de 1955. Esta solicitud se corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 6 de julio de 1955, bajo el registro

Las penicilinas procaínicas se pueden convertir en sales alcalinas mediante una reacción de metátesis con una sal alcalina de un ácido orgánico, sin necesidad de que la penicilina procaínica se disuelva por completo. En este proceso la penicilina procaínica se pone en suspensión, en forma de una papilla, en un líquido tal como isopropanol, acetona o butanona y se añade, en solución en isopropanol acuoso u otro disolvente que sea miscible con el líquido de suspensión, la sal alcalina de un ácido orgánico. La reacción de metátesis avanza lentamente, pero es posible conseguir la conversión completa al cabo de un tiempo relativamente largo.

Aparentemente sólo la penicilina procaínica que está en solución puede reaccionar y, en la medida que la sal alcalina de penicilina precipita, se disuelven y reaccionan nuevas cantidades de la penicilina procaínica. El proceso depende de las clases y cantidades de disolventes empleados; para conseguir una solución completa de la penicilina procaínica se requieren cantidades tan enormes de disolvente que el proceso sería antieconómico, no sólo por el coste del disolvente, también por las enormes cantidades de sales alcalinas de penicilina que quedarían disueltas y no precipitan.

Los autores de esta memoria presentan un procedimiento para la producción de sales estériles alcalinas de penicilina a partir de penicilinas procaínicas que pueden no ser estériles; tratan, además, de obtener un disolvente en el cual las penicilinas procaínicas sean muy solubles, las sales alcalinas de ácidos orgánicos relativamente solubles y las sales alcalinas de penicilina prácticamente insolubles.

De acuerdo con el procedimiento diseñado en esta memoria, las penicilinas procaínicas se disuelven por completo en una mezcla sustancialmente anhidra de cloroformo y una menor proporción de formamida, metanol, etanol o una mezcla de éstos, de forma que se obtenga una solución concentrada que contenga aproximadamente 40% de penicilina procaínica (40 gramos por 100 mililitros) en el disolvente. Esta solución se calienta a una temperatura entre 40°-60° C y luego se esteriliza, haciéndola pasar -todavía caliente-, a través de un filtro esterilizador. A esta solución estéril de penicilina procaínica se le adiciona una solución de acetato potásico o de otra sal alcalina de un ácido orgánico, disuelta en isopropanol, acetona u otro alcohol o cetona inferior, disolvente que también se debe esterilizar por filtración a través de un filtro adecuado; no es estrictamente necesario que esta solución sea anhidra, pero debe contener sólo las pequeñas cantidades de agua que sean precisas para disolver por completo toda la sal alcalina del ácido orgánico³⁵⁷. El volumen de esta solución de la sal alcalina del ácido orgánico ha de ser entre 3 y 5 veces mayor que el volumen de la solución de penicilina procaínica y, además, contener un ligero exceso de la sal alcalina respecto a la cantidad estequiométricamente requerida para la conversión completa de la sal de procaína en la sal alcalina de penicilina, pero en cantidad tal que no exceda a su solubilidad en la mezcla de reacción resultante, de modo que se impida la precipitación de la sal alcalina del ácido orgánico al mezclar las dos soluciones.

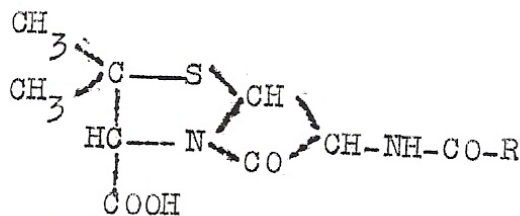
520.363/1955. La empresa figura como establecida en el 350 Fifth Avenue de Nueva York (EE. UU.). La patente española fue concedida el 7-XI-1955 y publicada el 16-XII-1955.

³⁵⁷ La cantidad de agua permisible en el disolvente es, en general, menor de 2% y, preferiblemente, menor del 1% del volumen del disolvente, siendo ventajoso mantenerla siempre en un mínimo. El agua presente en la mezcla de reacción aumenta la solubilidad de las sales alcalinas de penicilina y disminuye la solubilidad de las sales de las penicilinas procaínicas, interfiriendo en algunos casos, en tal medida, que no se obtiene conversión alguna de la penicilina procaínica.

La sal alcalina de penicilina comienza a cristalizar al cabo de unos pocos minutos después de que las soluciones se mezclen y la cristalización se deja proseguir hasta que no ocurra más separación. La sal alcalina de penicilina precipitada se separa de las aguas madre por filtración o por otro método usual, respetando todas las medidas asépticas para conseguir y mantener la esterilidad; a continuación se lava con una pequeña cantidad de disolvente estéril, generalmente el usado en la preparación de la solución de la sal alcalina del ácido orgánico, y se seca en una estufa estéril, preferiblemente en una estufa de vacío, a una temperatura de 35° C aproximadamente. Los autores proponen unos ejemplos aclaratorios de este procedimiento³⁵⁸.

2.2.5. Penicilinas biosintéticas

Tras esclarecerse, a finales de la década de 1940, la estructura común de las penicilinas: un anillo tiazolidínico (un anillo aminofenílico de los tiazoles) enlazado a un anillo β -lactámico a modo de cadena lateral, buena parte de las investigaciones se dedicaron a establecer sistemas que permitieran alterar este anillo lateral mediante la adición de distintos tipos de precursores, que incorporaban a la cadena nuevos grupos químicos; estas sustancias son conocidas como 'precursores de la penicilina'.



Penicilina (AHOEPM, patente 208.132).

Estos 'precursores de la penicilina' aportan el fragmento R de la penicilina; por eso, en un medio que contiene ácido fenil-acético se obtiene un mayor rendimiento de bencil-penicilina (penicilina G) y si el medio tuviese ácido p-hidroxi-fenil-acético se obtiene una proporción mayor de penicilina p-hidróxi-bencílica A.

Son conocidos procedimientos en los que se sugiere la incorporación de sustancias que contienen sulfitos en los medios de fermentación de penicilinas, en particular sulfitos metálicos del tipo de los tiosulfatos, pero su empleo suele quedar restringido para los denominados medios sintéticos, no para los medios de maceración de maíz; de hecho, el uso de sulfitos no alcanzó éxito entre los fabricantes de penicilina, ni en el Reino Unido ni en los Estados Unidos de América.

³⁵⁸ De la media decena de ejemplos que se incluyen en la memoria, comentamos el primero: una solución formada por 5 g. de penicilina G procaínica, no estéril, con una pureza de 990 U.I./mg., disuelta en una mezcla de 10,6 ml. de cloroformo y 1,9 ml. de formamida a 40° C, se hizo pasar, estando aún caliente, a través de un filtro dentro de un matraz estéril. A esta solución se le añadió, agitando al mismo tiempo, 37,5 ml. (3 volúmenes) de una solución, también esterilizada mediante un filtro, formada por 0,983 g. de acetato potásico disueltos en isopropanol al 99,5%, con lo cual cristalizó la penicilina potásica. La penicilina cristalizada se separó por filtración en forma aséptica, se lavó con 6 ml. de isopropanol estéril puro y se secó en una estufa de vacío estéril mantenida a una temperatura de ca. 35° C. Se obtuvieron 2,9 g. de penicilina G potásica estéril, con una pureza de 1.578 U.I./mg., lo que representa una recuperación del 92,8% del contenido en penicilina. El producto así obtenido no respondió a los ensayos de la penicilina procaínica y, por lo tanto, se dedujo que estaba libre de penicilina G procaínica sin convertir.

2.2.5.a. Derivados amínicos

El proceso de esterificación de las penicilinas tratando sus sales de plata con yoduros de alcohólo fue estudiado en los comienzos de la década de 1940³⁵⁹; para conseguir este fin se utilizó la reacción de los diazoalcanos con la penicilina o sus sales³⁶⁰. Hacia finales de la década, Frederick H. Carpenter³⁶¹ logró convertir el grupo carboxilo de la bencil-penicilina en un grupo básico, preparando el anhídrido de bencil-penicilina, haciendo reaccionar este anhídrido con beta-dimetil-amino-etil-éster y aislando el beta-dimetil-amino-éster en forma de su cloruro cristalino; pero este método adolece del defecto de que la preparación del anhídrido de bencil-penicilina es difícil.

Ninguno de los métodos empleados para esterificar las penicilinas tuvo validez industrial hasta los comienzos de la década de 1950. A. Vern McIntosh Jr., Elizabeth M. Meinzer y Robert H. Levin, propusieron, en la reunión de la *American Chemical Society* celebrada en Chicago, en la primavera de 1948, un nuevo método basado en el tratamiento del anhídrido de la bencil-penicilina con un alcohol que posea un grupo básico³⁶², pero como el anhídrido es inestable, este procedimiento exige una técnica complicada y se obtienen rendimientos bajos, con lo cual es difícil de emplear industrialmente.

Los ésteres de penicilina con amino-alcoholes, como por ejemplo dietil-amino-etanol, se acumulan en los tejidos pulmonares cuando son administrados parenteralmente, por lo que tienen un efecto terapéutico de gran valor en el tratamiento de las infecciones pulmonares y bronquiales. Las sales de tales ésteres son, en comparación con otras sales, fácilmente solubles en agua, por lo que se disuelven instantáneamente en los humores del cuerpo cuando se administran por medio de inyecciones. El inconveniente que presentan es que los derivados solubles de penicilina se descomponen con relativa rapidez en el organismo, por cuyo motivo es de desear obtener compuestos de penicilina que sean difícilmente solubles en agua, con el fin de lograr un efecto antibiótico prolongado. Una solución podría encontrarse en los hidroyoduros de los ésteres de estas sales, poco solubles en agua y, por ello, capaces de retardar la transmisión de estas sales a los pulmones; pero tienen el inconveniente de que se han detectado personas alérgicas al yodo, con lo cual la administración de tales hidroyoduros puede presentar un efecto secundario indeseable.

Con ánimo de mejorar este tipo de procedimientos, y dotarlos de utilidad industrial, un buen número de empresas –algunas de ellas españolas– desarrollan procedimientos que fueron objeto de patente.

³⁵⁹ Edward ABRAHAM, Ernst Boris CHAIN, E.R. HOLIDAY. "Purification and some physical and chemical properties of penicillin: with a note on the spectrographic examination of penicillin preparations". *The British Journal of Experimental Pathology*, 23(3): 103-119. Londres, 1942.

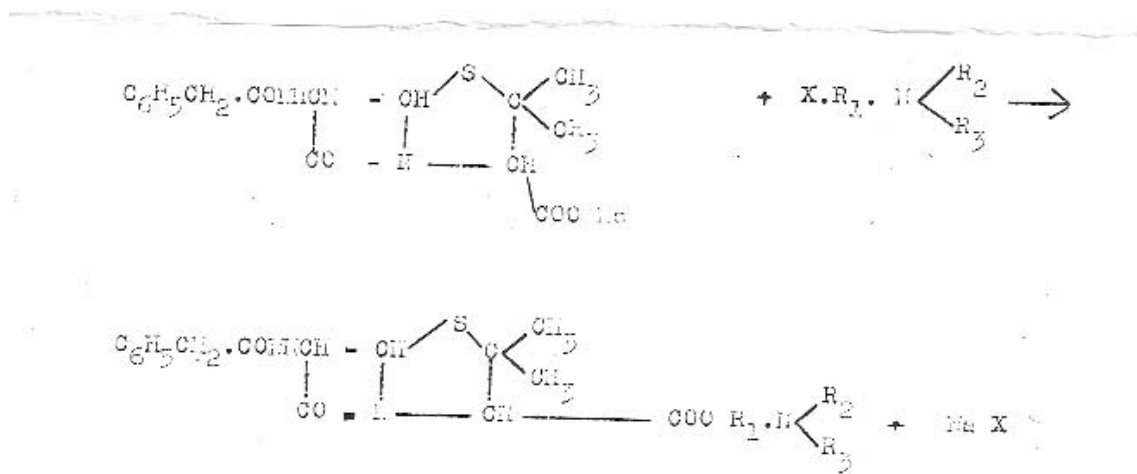
³⁶⁰ Kart MEYER, G.L. HOBBY, E. CHAFFEE. "On esters of penicillin". *Science*, 97(2513): 205-206. Washington DC, 1943; Max FRANKEL, Ephraim KATCHALSKI. "Derivatives of N-Carboxy- α -amino acid esters". *Journal of the American Chemical Society*, 65(9): 1670-1674. Washington DC, 1943.

³⁶¹ Frederick H. CARPENTER. "The anhydride of benzylpenicillin". *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2964-2966. Washington DC, 1948.

³⁶² A. Vern MCINTOSH Jr., Elizabeth M. MEINZER, Robert H. LEVIN. "Steroid acids and their transformation products. III. Desulfurization of thiol esters of 3(β)-hydroxy-5-cholenic and -bisor-5-cholenic acids". *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2955-2958. Washington DC, 1948.

El 6 de julio de 1950 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó, ante el registro de patentes español, un expediente para proteger, por veinte años, "Un procedimiento para la producción de amino-ésteres de penicilina"³⁶³.

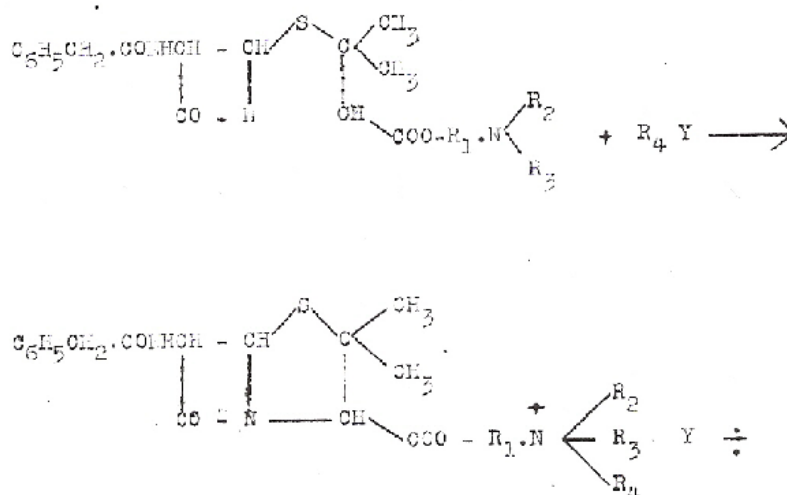
Usando como material de partida la sal sódica de bencil-penicilina de una mezcla de penicilinas producida por cultivo sumergido, los amino-ésteres pueden prepararse en la forma siguiente: se dispone una suspensión de penicilina sódica o se disuelve en un agente de dilución adecuado, tal como la cetona, y se utiliza un exceso de di-alcohol-amino-alcohol, después de lo cual la mezcla se mantiene en reposo a la temperatura ambiente, hasta que termine la reacción siguiente:



X representa un halógeno; R₁ es un radical alcohólico divalente; R₂ o R₃ junto al átomo de nitrógeno forman un anillo heterocíclico como en las piperidinas, morfolinas o piperacinas.

De la mezcla de reacción se separa el éster como tal o como una sal, con un ácido orgánico o inorgánico. En el caso de que se pretenda la formación de un compuesto amónico cuaternario es necesario hacer reaccionar un amino-éster de penicilina, por ejemplo bencil-penicilina, con un compuesto del tipo R₄-Y, del modo en que se indica:

³⁶³ AHOEPM, patente 193.814; la memoria descriptiva consta de veinte hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 6 de julio de 1950. El expediente se corresponde al presentado en Dinamarca, el 7 de julio de 1949, bajo el registro 2.288/49. La empresa tiene fijada su residencia en el 19, Bronshøjvej de Copenhague (Dinamarca). La patente española, de invención, fue concedida el 24-VII-1951 y publicada el 16-IX-1951.



R₄ represente un alcoholo e Y un halógeno, con preferencia yodo.

La sal sódica de penicilina utilizada en la reacción puede ser sustituida por otra sal metálica o por una sal de penicilina con una amina terciaria, tal como trietil-amina o procaína³⁶⁴.

La memoria incluye los resultados de los ensayos biológicos realizados con hidroyoduro de éster dietil-amino-etílico de penicilina en suspensión, en una mezcla acuosa de fosfato de carboxi-metil-celulosa ('preparado A'); éstos ponen en evidencia su superioridad frente a los preparados de penicilina hasta el momento conocidos, porque se acumulan en los tejidos pulmonares³⁶⁵. En posteriores experimentos se compara el 'preparado A' con penicilina-procaína, mostrándose de nuevo la acumulación de penicilina en los tejidos pulmonares. Estos experimentos demuestran que el 'preparado A' se acumula en los pulmones tanto cuando se administra en condiciones en que se obtiene un efecto de depósito ligero como en condiciones de depósito prolongado.

Los autores realizaron ensayos clínicos, con resultados equivalentes a los obtenidos en animales de laboratorio³⁶⁶; los experimentos demuestran que la acumulación del 'preparado A' ocurre en los pulmones del ser humano como ocurría en el caso de los animales, ya que tras la inyección del 'preparado A' es excretada mucha

³⁶⁴ Los autores citan, como ejemplo de haluros de aminas terciarias que pueden usarse en su método, y de los radicales que forman parte alcohólica de los nuevos ésteres, los siguientes: cloruro de dietil-amino-etilo, cloruro de metil-aunaril-amino-etilo, cloruro de dietil-amino-etilo, dimetil-amino-2-cloro-propano, cloruro de bencil-etil-amino-etilo, cloruro de bencil-metil-amino-etilo, cloruro de dibencil-amino-etilo, N-(beta-cloroetil)-piperidina y N-(beta-cloroetil)-morfolina.

³⁶⁵ En la memoria se exponen los resultados de la experimentación realizada con conejos de indias: 25.000 unidades de 'preparado A' (*vide supra*) fueron disueltas en 25 cm³ de solución salina; esta solución se inyectó a un conejo de indias; a otro conejo se le inyectaron 25.000 unidades de bencil-penicilina en 2,5 cm³ de solución salina. Los dos animales se sacrificaron media hora más tarde; las concentraciones de penicilina fueron determinadas en sangre, hígado, bazo y pulmones. Los resultados ponen en evidencia que el 'preparado A' origina una menor concentración en la sangre que la bencil-penicilina, pero produce una concentración cinco veces mayor en los pulmones.

³⁶⁶ Se trató un grupo de pacientes con bronquitis crónica y expectoración abundante, inyectándoles subcutáneamente 600.000 unidades de penicilina procaínica; a otro grupo similar de pacientes se trató con el 'preparado A' (*vide supra*) en suspensión, en 1,8 cm³ de solución salina.

más penicilina por los pulmones que en el caso de penicilina procaínica. Se han ensayado otros dos productos, el hidro-cloruro y el hidro-yoduro del éster dietil-amino-etílico de penicilina, que muestran propiedades muy similares³⁶⁷.

El 23 de mayo de 1951 es una compañía norteamericana, *Comercial Solvents Corporation*, quien entrega en el registro español de patentes una solicitud para proteger, por veinte años, “Un procedimiento de preparar una sal de penicilina”³⁶⁸; en concreto, sales de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina, una sal estable, de baja toxicidad y capaz de mantener prolongados niveles terapéuticos de penicilina en sangre, tanto si se administra por vía oral como inyectable.

Esta composición se puede preparar mezclando un equivalente de una sal de penicilina soluble en agua, como por ejemplo penicilina potásica en solución acuosa, con dos equivalentes de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina, también en disolución acuosa. La sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina precipita de la solución y se recupera de ella por filtración y secado; el compuesto presentó un punto de fusión de 186°-188° C, con descomposición.

La N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina es una combinación racémica y solamente el levo-isómero es capaz de reaccionar para formar la sal con la penicilina. El dextro-isómero de la base no forma una sal de penicilina y se recupera del filtrado cuando el pH de éste se regula, entre 9 y 10, por medio de una solución acuosa de hidróxido sódico. Por ello un mol de penicilina potásica se hace reaccionar con dos moles de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina, obteniéndose así rendimientos casi cuantitativos basados en la cantidad de penicilina utilizada.

Los autores realizaron ensayos de concentración en sangre de la sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina, administrada oralmente y por vía

³⁶⁷ La memoria incluye una veintena de ejemplos, similares entre si, de los que comentamos el primero de ellos: a una suspensión de 22 g. de la sal sódica de penicilina en 300 cm³ de acetona anhidra se añaden 12 cm³ de cloruro de dietil-amino-etilo; durante dos días la mezcla se ha de agitar mecánicamente, a la temperatura ambiente. El cloruro de sodio formado precipita y se separa por filtración; la acetona se evapora del filtrado en vacío hasta reducir el volumen a un valor de 50 cm³, a continuación se añaden 300 cm³ de éter de petróleo; se deja reposar en hielo durante tres horas. El éter de petróleo se decanta del aceite desprendido y este último se lava con 50 cm³ de éter de petróleo; el aceite se disuelve en 20 cm³ de alcohol anhidro y, a la última solución, se le añade una solución de cloruro de hidrógeno en éter, enfriando y agitando, se diluye en agua hasta que el pH sea de 6. Ya en estas condiciones, se añaden 200 cm³ de acetato de amilo a la solución clara, con lo cual cristaliza el hidrocloreto del éster dietil-amino-etílico de penicilina. Se deja reposar la mezcla a 0° durante dos horas y esta sal se separa por filtración. Se han obtenido 20.4 g., que representen el 70% del valor teórico; el punto de fusión es de 140°-150° C, y el contenido en nitrógeno de 8,9%, muy parecido al teórico que es de 8,94%; la potencia de la sal se ensayó con *Staphylococcus aureus*, dio un valor de 1.200 U.I./mg. El yoduro del éster dietil-amino-etílico de penicilina, que es escasamente soluble en agua, se prepara de forma similar a la dicha para el hidrocloreto, pero se facilita su preparación por adición de una solución de un yoduro soluble, como puede ser el de potasio, a una de las sales solubles del éster dietil-amino-etílico de penicilina, tal como el fosfato o el hidrocloreto, separándose el hidrocloreto del éster dietil-amino-etílico de penicilina por cristalización, que presenta un punto de fusión, después de haber sido extraído, de 173°-174° C; determinada su potencia con *Staphylococcus aureus* dio un valor de 1.000 U.I./mg.

³⁶⁸ AHOEPM, 198.008; la memoria descriptiva consta de trece hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras, firmadas en Madrid, a 23 de mayo de 1951; esta solicitud se corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América con fecha 24 de mayo de 1950, bajo el número 164.029/50. La entidad figura establecida en City of Terre Maute (Indiana. EE. UU.). La patente española fue concedida el 23-V-1951 y hecha pública el 16-VI-1951.

intramuscular a perros, y midieron la cantidad de penicilina en la corriente sanguínea a intervalos definidos después de la administración. Los resultados obtenidos se presentan anejos a la memoria; en ellos se muestran los niveles de penicilina en sangre obtenidos después de inyectar intramuscularmente, en solución acuosa, una cantidad de la nueva combinación penicilínica y los niveles sanguíneos logrados tras la aplicación de procaína-penicilina, cuando este producto se inyectó por vía intramuscular a razón de 60.000 U.I. cada perro. El estudio comparado de ambos conjuntos de datos permite aseverar que el producto que ahora se presenta da niveles de antibiótico en sangre muchos más largos que la forma de penicilina hasta ese momento más empleada.

Otros datos experimentales muestran niveles de antibiótico en sangre cuando la sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina fue administrada por vía oral, dando a cada perro una dosis de 100.0000 U.I; y el de antibiótico en la sangre obtenido cuando se administró procaína-penicilina por vía oral, administrando a cada perro 100.000 U.I. Al comparar ambos conjuntos de datos se observa que la nueva combinación ofrece niveles de antibiótico en sangre tan aceptables como la forma de penicilina en este momento de uso más generalizado.

En otro estudio comparativo se muestran los niveles sanguíneos de antibiótico que se obtienen cuando la sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina en una suspensión de aceite de cacahuete se inyectó intramuscularmente en perros; y los niveles de antibiótico en sangre obtenidos cuando se inyectó intramuscularmente procaína-penicilina en suspensión en aceite de cacahuete.

La memoria aporta, además, un sumario de datos clínicos obtenidos cuando se usó terapéuticamente, en el hombre, la sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina; en cada caso se inyectó intramuscularmente una sola dosis de 300.000 U.I. del compuesto indicado y se anotó el nivel de la concentración de antibiótico en sangre. Con fines comparativos, se muestran los niveles en la sangre de antibiótico obtenidos tras inyectar intramuscularmente, en hombre, procaína-penicilina en una dosis de 300.000 U.I. Al comparar ambos conjuntos de datos se observa que la sal de penicilina N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina origina, en sangre, niveles de antibiótico con actividad terapéutica más largos que cuando se inyecta una preparación de penicilina-procaína.

Un nuevo anexo muestra los resultados de ensayos de toxicidad de la sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina realizados con ratones en el laboratorio. Los datos señalan la cantidad de la nueva combinación que puede administrarse sin producir muertes en los ratones, y la cantidad necesaria para producir una matanza de los ratones; la sal de penicilina se inyectó intraperitoneal y subcutáneamente. Los resultados señalan que la dosis mínima de la sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina que muestra irritación cutánea es mayor de 200 mg./kg. de peso del cuerpo de los ratones de ensayo, pero menor de 400 mg./kg. del peso de los mismos. Una sola dosis de 6.000.000 U.I. de la sal de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina en suspensión acuosa se inyectó, de manera subcutánea, en dos perros que estuvieron en período de observación durante 48 horas; durante ese tiempo no se descubrieron síntomas irritativos.

El 13 de julio de 1951 la empresa norteamericana *Wyeth Inc.* presentó a registro, solicitando su protección bajo patente de invención, "Un procedimiento de preparar

sales de penicilina insolubles en agua”³⁶⁹, referido a sales mono- y polisustituidas amino-alquilen-diamínicas, virtualmente insolubles en agua, que son sales alquilen-diamínicas de penicilina sustituidas, que comprende formar una sal soluble en agua de una alquilén-diamina haciendo reaccionar esta última con un ácido, separar la sal alquilén-diamínica soluble en agua, disolver dicha sal en un agente acuoso y añadir a esta solución acuosa una sal de penicilina para formar una sal penicilínica de la alquilén-diamina, que es relativamente insoluble en agua y precipita de dicha solución acuosa.

Las diaminas utilizadas en este procedimiento tienen las siguientes fórmulas generales: $R-NH-(CH_2)-NH_2$; $R-NH-(CH_2)_n-NH-R_1$ y $RR_1N(CH_2)NH_2$ [R y R_1 pueden representar radicales alifáticos, aromáticos, alicíclicos y heterocíclicos, con sustituyentes en los anillos o sin ellos; n representa un número mayor de 1, generalmente de 2 ó 3]. Las alquilén-diaminas usadas en el aislamiento de sales de penicilina son las N,N'-dibencil-etilén-diaminas no sustituidas y aquellas combinaciones aralquílicas que tienen sustituyentes no interferentes en el anillo; estos sustituyentes, que también pueden estar en los anillos alicíclicos y heterocíclicos así como en las cadenas alquílicas, pueden comprender uno o más sustituyentes de anillo de alquilo, alcoxi, halógeno, amino u oxi. No se ha encontrado sustituyente que interfiera con la reacción de las N,N'-diaminas secundarias disustituidas con sales de penicilina para formar productos de reacción con ellas.

Para preparar las diaminas disustituidas utilizadas en este procedimiento se parte de un aldehído o cetona que puede, si se desea, disolverse en alcohol o benceno. Al aldehído o cetona se le añade la alquilén-diamina en solución acuosa; se forma una diamina que tiene la fórmula general: $R=N(CH_2)N=R_1$, donde R y R_1 tienen el significado señalado líneas arriba. La diamina obtenida se separa, se hidrogena por reducción catalítica o por una combinación de alcohol o ácido y metal. Las bases polisustituidas pueden obtenerse por la reacción de un di-halogenuro alquilénico, tal como un di-bromuro, di-cloruro o di-yoduro, con la amina apropiada.

Las sales de diamina etilénica sustituida pueden también prepararse haciendo reaccionar cantidades aproximadamente equivalentes de una sal de etilén-diamina³⁷⁰ y un ácido con formaldehído³⁷¹ en un disolvente adecuado, tal como agua, alcohol u otros disolventes orgánicos o mezclas de los mismos, dando por resultado una sal etilén-diamínica N,N-disustituida, que se puede transponer a la base libre por tratamiento con álcali.

Las diaminas etilénicas sustituidas, o sus sales, se preparan haciendo reaccionar una diamina etilénica con un aldehído o cetona en ácido fórmico como disolvente. Este método se puede mejorar empleando el di-formato de la diamina etilénica y sustituyendo el ácido fórmico por etanol, otros alcoholes, disolventes orgánicos o agua.

³⁶⁹ AHOEPM, patente 198.789; la memoria descriptiva consta de treinta y nueve hojas, escritas por una sola de sus caras; queda firmada en Madrid, a 13 de julio de 1951; su texto se corresponde con el presentado en los Estados Unidos de América con fecha 15 de julio de 1950, bajo el registro número 174.115/50. La empresa figura como establecida en el 1.401 Walnut Street de Filadelfia (Pensilvania. EE. UU.). La patente española fue concedida el 20-VII-1951 y publicada el 1-IX-1951.

³⁷⁰ Como puede ser el di-hidro-cloruro, di-hidro-bromuro, di-nitrato, di-formato, di-acetato u otra sal adecuada de tiamina etilénica.

³⁷¹ Bien en forma de una solución acuosa o en forma polimérica sólida, y con una combinación que contenga un hidrógeno activo, tal como el alfa-hidrógeno de los tiofenos, picolinas, quinaldinas, fenoles, nitro-combinaciones alifáticas, ácidos orgánicos y ésteres y cetonas de cadena abierta y cíclicos.

Si el producto obtenido se ha de emplear para preparar combinaciones de penicilina, es conveniente usarlo en forma de sal y no como base libre.

Las sales pueden formarse a partir de la base libre disuelta en un disolvente como el éter, al cual se le ha añadido el ácido que proceda, según la sal particular que se quiera fabricar. Las sales obtenidas pueden ser mono- o di-sales, dependiendo de la cantidad relativa de reactivos empleados; si se emplea un equivalente molar de ácido frente a un equivalente molar de base, se forma la mono-sal; si se usan dos equivalentes molares, o un exceso de ácido, con un mol de la diamina, se formará la di-sal. En general, es deseable obtener la doble sal en lugar de la mono-sal, pues en el primer caso se combinan dos moles de penicilina, frente a un solo mol de penicilina que se combina en la mono-sal. Los ácidos que se pueden emplear para formar las sales de las alquilenodiaminas sustituidas de base libre pueden ser orgánicos o inorgánicos³⁷². Aunque otras formas de sales resultan adecuadas, las combinaciones orgánicas citadas forman sales solubles altamente deseables, cuya solubilidad en agua pasa del 5% de peso por unidad de volumen de líquido, a unos 30° C.

Las sales di-amínicas de penicilina se disuelven, en general, en un agente acuoso y se hacen reaccionar con una solución de sal de penicilina acuosa. Si las reacciones han de tener lugar en un medio acuoso, es conveniente usar sales di-amínicas relativamente solubles al preparar las sales de penicilina, ya que se maneja un volumen menor de líquido y, por lo tanto, las pérdidas son probablemente menores que si se usasen sales relativamente insolubles. No conviene emplear las sales obtenidas con los ácidos inorgánicos para preparar las combinaciones de penicilina, pues se ha comprobado que su solubilidad es muy baja, inferior al 5% en peso. Las sales orgánicas poseen una mayor solubilidad; así, por ejemplo, los di-acetatos tiene una solubilidad del orden del 10% o más, por lo que resultan particularmente eficaces cuando se desea tratar volúmenes de líquido relativamente bajos y, por lo tanto, de altas concentraciones.

Cualquiera de las sales solubles de penicilina conocidas puede combinarse con las diaminas sustituidas; ello permite usar las sales de penicilinas alcalinas o alcalinotérreas, las preferidas son las sales sódica o potásica de la penicilina G: una o dos moléculas de penicilina se unirán con una molécula de diamina, dependiendo de que se emplee mono-sal o di-sal. A través de casos prácticos, en la memoria queda anotada la preparación de N,N-dibencil-etilén-diamina, N,N-dipiperonil-etilén-diamina, N,N'-difurfuril-etilén-diamina, N,N'-bis-(gamma-fenil-propil)-etilén-diamina, N,N'-bis-(4-metil-2-pentil-etilén-diamina), N,N'-bis-(p-cloro-bencil)-etilén-diamina, N,N'-bis-(p-nitro-bencil)-etil-diamina, N-mono-(p-hidroxi-bencil)-etilén-diamina, N,N'-bis-(para-amino-bencil)-etilén-diamina, N,N'-bis-(p-metoxi-bencil)-etilén-diamina, N,N'-bis-(2-tenil)-etilén-diamina, N-bencil-N'-alfa-etil-bencil-etilén-diamina, N,N'-bis-(para-metil-bencil)-etilén-diamina, 10-bis-(bencilamino)-decano, 1,3-bis-(bencil-amino)-propano, N,N'-bis-(beta-fenil-etil)-etilén-diamina, dihidro-cloruro de N,N'-bis-(p-hidroxi-bencil)-etilén-diamina, N,N'-bis-(p-metoxi-bencil)-etilén-diamina y sus sales correspondientes³⁷³. En la memoria se incluyen unos ejemplos que ilustran la

³⁷² Los ácidos inorgánicos empleados son clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico o bromhídrico. Los ácidos orgánicos utilizados son acético, succínico, málico, amino-acético y tartárico.

³⁷³ Nos ocupamos sólo del primero de ellos, destinado a la preparación de N,N-dibencil-etilén-diamina y sales de la misma: una cantidad de 15 g. (0.25 moles) de etilén-diamina se añadió, gota a gota, a 100 ml. de ácido fórmico al 89%-100%, en un frasco de 500 ml. que tenía dos cuellos, provisto de un tubo adicional y de condensador de reflujo, con tubo de desecación, enfriado en un baño de hielo; tras la adición completa de la diamina, se añadieron por cada cuello 53 g. de benzaldehído (0.5 moles); el baño de hielo se retiró y el frasco se calentó a la temperatura de reflujo; el desprendimiento inicial de dióxido

preparación de sales de penicilina partiendo de las correspondientes diaminas alquilénicas sustituidas³⁷⁴.

Las sales de penicilina pueden también prepararse mezclando soluciones no acuosas de penicilina libre con soluciones no acuosas de bases orgánicas, empleando un disolvente adecuado como puede ser éter, acetona, acetato etílico o acetato amílico, entre otros. Según informan los autores de esta memoria, estas sales son insolubles en la mayoría de los disolventes de laboratorio, pero son bastante solubles en dimetil-formamida. Las sales se precipitan de este disolvente con una adecuada adición de agua. El tamaño de las partículas puede igualarse a la magnitud deseada; la recristalización se logra en acetona y formamida.

Un gran número de combinaciones de estas sales de penicilina, en especial las de más alto peso molar, son insolubles o escasamente solubles en agua, por ello se puede conseguir la precipitación del extracto de penicilina neutralizado. Las sales di-amínico-penicilínicas se pueden usar para fines terapéuticos, en forma de inyección; para ello se han de combinar con un agente dispersante, tal como la hialuronidasa, o con un vehiculo de aceite vegetal con cera de abejas o gel de mono-estearato de aluminio; la composición se prepara de igual manera que cualesquiera otras sales de penicilina escasamente solubles.

La empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó a registro, con fecha 12 de septiembre de 1951, una nueva solicitud de patente de invención, ésta destinada a proteger “Un método para la producción de preparados de penicilina”³⁷⁵, en

de carbono fue muy rápido; al cabo de 20 minutos la velocidad de desprendimiento del gas era de 100 ml./minuto y decreció a 8 ml./minuto en una hora; el calentamiento a reflujo continuó durante 25 horas. Se preparó una segunda solución de manera similar a la primera, con la pequeña diferencia de que los 100 ml. de ácido fórmico que ahora se añadieron tenían una concentración en ácido del 88%-90%; se desprendió dióxido de carbono a una velocidad ligeramente inferior que en el caso anterior. Se mezclaron ambas soluciones y la mayor parte del exceso de ácido fórmico se separó a presión reducida; al residuo, ambarino-viscoso, se le añadió 200 ml. de ácido clorhídrico 6 N; al cabo de 15 minutos de realizar esta operación fue preciso enfriar y filtrar para separar el dihidro-cloruro cristalino que se había formado; se lavó con isopropanol, se secó, el punto de fusión se estableció a 300° C. Los líquidos madre fueron sometidos a reflujo durante una hora y se enfriaron, obteniéndose una cantidad adicional del producto que presentaba un punto de fusión de 300° C; se filtró, se concentró al vacío a 100 ml., se enfrió y se alcalinizó con NaOH al 40%; el aceite que sobrenadaba se extrajo con éter, también se secó y se fraccionó: la primera fracción, a 106° C y a 0.0-0.7 mm., fue N-bencil-etilén-diamina, que se presentó como un líquido incoloro; el dihidro-cloruro cristalino se convirtió en base libre por medio de hidróxido sódico acuoso; se desheló sobre hidróxido sódico a 153°-158° C a 0.5 mm.; el destilado, incoloro, solidificó en cristales blancos de punto de fusión 24°-25° C.

³⁷⁴ Concretamente aborda la preparación de N-momo-dipenicilina-bencil-etilén-diamina, N-mono-dipenicilina-(p-hidroxibencil)-etilén-diamina, di-penicilina N,N'-dibencil-etilén-diamina, dipenicilina N,N'-dipiperonil-etilén-diamina y dipenicilina N,N'-difurfuril-etilén-diamina. Como en los casos anteriores, hacemos referencia al primero de ellos, que puede servir como modelo de los restantes; preparación de N-momo-dipenicilina-bencil-etilén-diamina: se disuelven en 2 cm³ de agua, 224 mg. de hidrocloreto de N-momo-bencil-etilén-diamina; a esta mezcla se le añade una solución formada por 212 mg. de penicilina sódica disueltos en 2 cm³ de agua; resultó una solución diáfana. A los pocos minutos precipitó un aceite, la capa de agua se separó y el aceite se colocó en un desecador sobre pentóxido fosfórico; al poco rato se formaron unos cristales blancos y todo el aceite se solidificó. Calentando entre 134° y 191° C, este material se funde e inmediatamente se solidifica en una masa espumosa, blanca y muy viscosa; a 191° C el sólido se fundió en un líquido que se oscureció y descompuso sin dar la masa espumosa blanca.

³⁷⁵ AHOEPM, patente 199.562; la memoria descriptiva consta de seis hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; está firmada, en Madrid, a 12 de septiembre de 1951. El expediente se

el que describe un procedimiento para obtener preparaciones de penicilina de efecto retardado al ser inyectadas en el torrente circulatorio.

Los autores parten de la base de que cuando se pone en suspensión penicilina, sales de penicilina o compuestos similares en soluciones de mono-estearato de aluminio o de di-estearato de aluminio en aceite, se consigue un efecto prolongado de la acción de la penicilina. Los experimentos realizados con inyecciones intramusculares de tales preparados señalan que, en el torrente circulatorio, poco después de la inyección, se encuentra una concentración de penicilina menor que si no se hubiese usado en la preparación mono-estearato de aluminio y, por otra parte, se encontrará durante un tiempo más prolongado una concentración de penicilina que excede al mínimo al cual puede observarse un efecto terapéutico.

Los autores de esta patente pretenden obtener preparados de penicilina inyectables usando sales de aluminio con ácidos lipofílos, especialmente sales básicas como el mono-estearato y el di-estearato de aluminio, incluso si el compuesto de penicilina es un éster básico de penicilina, particularmente un éster de penicilina con un alcohol amínico terciario o sales del mismo. Las preparaciones que así se obtienen conservan su cualidad de acumular penicilina en el tejido pulmonar y poseen un efecto retardado³⁷⁶.

Además de estearatos, se pueden emplear otras sales de ácidos grasos; los autores señalan que se ha obtenido un buen efecto administrando sales de los ésteres de penicilina con amino-alcoholes en suspensiones en aceite, como el aceite de cacahuete o aceite de sésamo, conteniendo también 1%-3% de una de dichas sales básicas de aluminio con un ácido graso.

Cuando se emplea una sal del éster de penicilina escasamente soluble en agua, que tiene por sí misma un efecto retardado en comparación con las sales más solubles, la utilización de sal básica de aluminio con grupos ácidos lipófilos da como resultado un retardo ulterior; un ejemplo típico de sales escasamente solubles de amino-alcoholes de penicilina son los hidro-yoduros.

El 10 de noviembre de 1952 es una empresa española, *Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.*, quien presenta ante el registro de patentes una solicitud para

corresponde al presentado en Dinamarca, el 13 de septiembre de 1950, bajo el registro 2.991/50. La empresa tiene fijada su sede en el 19, Bronshøjvej de Copenhague (Dinamarca). La patente española, de invención, fue concedida el 5-X-1951 y publicada el 16-XI-1951.

³⁷⁶ Los autores ilustran su procedimiento mediante un caso práctico: unos 20 g. de mono-estearato de aluminio se añaden a 1 l. de aceite de cacahuete; la mezcla se calienta lentamente, con agitación, hasta que se obtenga una solución clara. Este calentamiento se continúa hasta que la solución tenga una temperatura de 135° C, que se mantiene durante ½ hora a 1 hora; a continuación se enfría a 25° C. Se añaden luego 390 g. de hidro-yoduro del éster dietil-amino-etílico de penicilina G, con un tamaño de partículas de 2-5 micras y una potencia de 1.000 U.I./mg., determinada mediante ensayo del preparado contra *Staphylococcus aureus*, usando penicilina sódica como patrón. La mezcla final contiene 300.000 U.I./cm³. Se experimentó con dos grupos de conejos, cada grupo estaba formado por 25 animales y cada conejo pesaba, aproximadamente, 2 kg.; en el primer grupo, de 25 conejos, se inyectó intramuscularmente, a cada conejo, 45.000 U.I. del preparado producido en la forma citada, después de lo cual se determinó la concentración de penicilina en sangre durante varios periodos de tiempo tras la inyección; el segundo grupo se usó de control; se inyectó a cada animal de este grupo la misma composición que en el primero, salvo la presencia de mono-estearato de aluminio. Los datos ponen de manifiesto la mayor concentración de penicilina en sangre obtenida con el preparado objeto de esta patente.

proteger, por veinte años, una invención relacionada con “Un procedimiento para preparar nuevos derivados de penicilina dotados de gran poder difusor”³⁷⁷.

Los autores de la memoria presentan un procedimiento, deducido por investigaciones realizadas en el laboratorio de la empresa, que consiste en la reacción de determinados halógenos con el ácido penicilínico, en solventes adecuados, a fin de operar en medio completamente homogéneo. Los ésteres formados se aíslan, purifican y transforman en derivados salinos, los cuales son productos difícilmente solubles, por lo que van suministrando éster lentamente y, debido a su gran difusibilidad, principalmente por los tejidos pulmonares, los hacen aptos para la terapéutica³⁷⁸.

En definitiva, se trata de un procedimiento que permite obtener nuevos derivados de penicilina de gran poder difusor, caracterizado porque se preparan ésteres dialquil-amino-alquílicos de penicilina, cuando se hace reaccionar penicilina ácida con

³⁷⁷ AHOEPM, patente 206.205; la memoria descriptiva consta de seis hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 10 de noviembre de 1952. La empresa figura como domiciliada en Barcelona, avenida Marqués de Argentera 21. La patente fue concedida el 22-XI-1952 y hecha pública el 1-I-1953.

³⁷⁸ Los autores aclaran su procedimiento con un ejemplo: en 100 cm³ de agua destilada se disuelven 37.5 g. de sal potásica de penicilina; la solución se introduce en un matraz provisto de un agitador, termómetro y embudo de llave; se enfría fuertemente la solución con hielo, hasta conseguir que la temperatura de la mezcla sea inferior a 0° C; se añaden 500 cm³ de éter puro y exento de alcohol, aunque no es necesario que sea seco; se agita bien la mezcla de manera que se forme una emulsión perfecta; mediante un embudo de decantación se añaden *ca.* 30 g. de una solución de ácido fosfórico al 20% hasta que el pH de la solución sea de 2-2,5, pero no inferior a este valor. La temperatura durante todo el tiempo debe ser inferior a 0° C; se decanta la solución etérea de penicilina ácida y se extraen de nuevo las aguas madre con unos 500 cm³ de éter; el éter debe ser secado con un poco de sulfato sódico anhidro; el éter es filtrado y se lava el sulfato sódico con éter seco; el volumen de éter que en este momento se dispone es de *ca.* 1.5000 cm³, el éter se enfría con un baño de anhídrido carbónico sólido y éter de petróleo ligero, hasta conseguir una temperatura de -70° C; esta temperatura se mantiene durante media hora y se decanta el éter del hielo que se ha formado. Así se obtiene la solución del ácido de penicilina en medio completamente anhidro; el éter seco es evaporado al vacío a una temperatura comprendida entre 0° y 2° C; el éter se recoge en un matraz adecuado. El ácido así formado se mantiene al vacío de unos 0,01 mm. para secarlo completamente. El ácido obtenido se disuelve con 200 cm³ de cloroformo purísimo, que previamente se ha lavado con sulfúrico y destilado con pentóxido de fósforo; la solución obtenida se mantiene a la temperatura de 0° C y se le añaden 37 cm³ de beta-bromo-etil-dietil-amina recién destilado y completamente seco a unos 50 cm³ de cloroformo. La mezcla se mantiene a 0° C unos minutos y luego se calienta a 50° C durante tres horas y se deja reposar hasta el día siguiente. El cloroformo se lava primeramente tres veces con agua, luego con una solución de fosfato tampón a pH 7 y finalmente con agua. El cloroformo se seca sobre sulfato sódico anhidro purísimo y se destila a 40° C, en un vacío de 0,1 mm.; el residuo se disuelve en éter sobre sodio y se filtra. El volumen de éter con la penicilina así obtenida es de unos 100 cm³. A la solución etérea de éter se le añaden 100 cm³ de éter de petróleo; se enfría en baño de nieve carbónica a una temperatura entre -50° y -60° C; se decantan las aguas madre del sólido formado, el cual se disuelve en éter, se añade más éter de petróleo y se enfría como antes; finalmente el residuo se lava con éter de petróleo y se evapora este solvente al vacío, hasta que quede un residuo completamente seco. Este residuo se disuelve en unos 100 cm³ de alcohol absoluto y se enfría a una temperatura de -20° a -30° C; se añade una cantidad equivalente de ácido yodhídrico de la mayor concentración posible; para la cantidad que se ha indicado se deben añadir 10 g. de ácido yodhídrico al 90%, este ácido tiene que ser de color blanco y además recién destilado; se ha de controlar que las aguas madre tengan un pH de 2 a 3. El precipitado obtenido se filtra y se lava con éter, se resuspende en un volumen pequeño de acetona, se añade un volumen igual de éter y se filtra de nuevo; el lavado ha de ser muy cuidadoso pues puede haber absorbidas pequeñas cantidades de ácido yodhídrico. El precipitado se seca al vacío y se guarda en frascos cerrados y protegidos de la luz. El rendimiento es del 70% y la valoración de la potencia del producto dio un valor de 1.000 U.O./mg.; valor que, teniendo en cuenta el posible error que se pueda cometer en el método de valoración, concuerda perfectamente con la sal yodhidrato del dietil-amino-etanol-éster de la penicilina.

dialquil-bromo-alquil-aminas, en la proporción de dos moles de base por mol de ácido de penicilina, en solución homogénea.

El 13 de noviembre de 1952 esta misma empresa española, *Unión Químico-Farmacéutica* S.A.E. solicitó protección, por veinte años, para una invención relacionada con un “Procedimiento de preparación de una sal de penicilina, dotada de gran poder retardador”³⁷⁹.

Los autores señalan el interés de los estudios dirigidos a la obtención de preparaciones de sales de complejos salinos de la penicilina con bases orgánicas, para lograr que el producto obtenido posea una gran estabilidad frente a un amplio campo de valores de pH y, fundamentalmente, que esté dotado de una alta insolubilidad, lo que hace que posea un gran poder retardador. La unión de estas dos propiedades confiere al producto que las posee un gran valor en lo que respecta al empleo de la penicilina, tanto por vía oral como en inyecciones, y una buena disponibilidad para conseguir almacenajes de larga duración del producto en cuestión. Por supuesto estas dos buenas cualidades han de estar acompañadas de una toxicidad mínima del producto.

Los autores mantienen que ellos han conseguido reunir estas características en un producto de su invención: un complejo salino de penicilina y N-N’-dibencil-etilén-diamina. El procedimiento que describen comprende una primera fase relativa a la preparación de la base N-N’-dibencil-etilén-diamina y su condensación con la penicilina. El proceso operatorio comprende la obtención de una sal soluble de dibencilen-diamina, como podía ser un acetato, preferentemente el diacetato, que se puede originar a partir de la base, cuando reacciona con dos equivalentes de ácido acético. La base se prepara haciendo reaccionar un derivado acilado de la bencil-amina, tal como p-toluen-sulfamida, formamida, o acetamida correspondiente, con 1,2-dibromo-etano, en condiciones adecuadas de tiempo y temperatura.

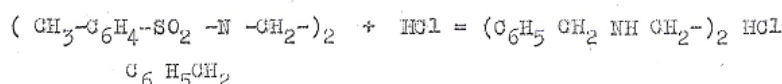
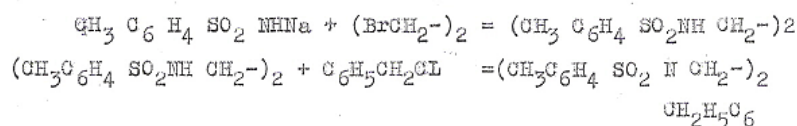
Es posible realizar este procedimiento en otras variantes de su fase inicial, toda vez que en ella se trata esencialmente de la protección del grupo de la bencil-amina por un radical ácido, éste puede ser el ácido p-toluen-sulfónico en forma de amida y otro radical ácido, tal como el ácido fórmico, acético u otro.

En la fase inicial se puede hacer reaccionar un derivado alquilado de la p-toluén-sulfamida, tal como etilén-di-para-toluén-sulfamida con cloruro de bencilo en presencia de metilato sódico. A continuación se realiza un proceso de purificación, consistente en transformarlo en clorhidrato, del cual se pasa a la base que, por destilación fraccionada, se purifica y de la cual se prepara el diacetato. La segunda fase, de condensación del derivado de la sal de penicilina obtenido, se realiza disolviendo un peso dado de penicilina potásica en 10 veces su volumen en agua y, en la solución resultante, se añade el diacetato de dibencil-etilén-diamina en cantidad igual a la mitad del peso de la penicilina, disuelto en su volumen de agua; al hacer la mezcla hay que agitar enérgicamente. Esta mezcla se deja en la nevera durante un día; luego se filtra y se lava el residuo con acetona al 50% y, por último, con éter seco. El producto se seca al vacío

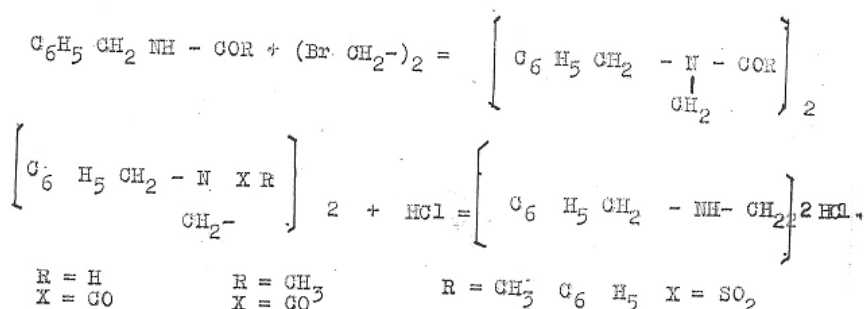
³⁷⁹ AHOEPM, patente 206.255; la memoria descriptiva queda firmada en Madrid, a 13 de noviembre de 1952. La empresa figura como domiciliada en Barcelona, en el número 21 de la avenida Marqués de Argentera. La patente fue concedida el 24-XI-1952 y hecha pública el 1-I-1953. Pese a tratarse de una ‘patente de invención’, los autores señalan: “La presente invención, ya ha sido desarrollada con éxito en el extranjero”.

a la temperatura de 40° C. Se obtiene un polvo microcristalino, cuya potencia es de 1.000-1.300 U.O./mg.

Las fases de obtención de la base N-N'-dibencil-etilén-diamina se indican a continuación³⁸⁰.



6



³⁸⁰ El proceso operatorio lo aclaran los autores con el ejemplo que se detalla a continuación: en un autoclave de reacción se introducen 4 kg. de p-toluen-sulfamida y 1,9 kg. de 1,2 dibromo-etano con 5 l. de alcohol; la mezcla se agita y se calienta a 100° C, durante un tiempo de 8 horas. Realizada la reacción se deja enfriar a unos 50° C y se filtra en caliente la solución alcohólica; con ello se separa del residuo salino. Este residuo salino se lava con alcohol caliente varias veces, empleando un total de 6 l. Los líquidos alcohólicos se llevan otra vez al autoclave y se les añade 1 kg. de metilato sódico en polvo. Se calienta todo a reflujo durante una hora y luego se deja enfriar. Se añaden 1,5 kg. de cloruro de bencilo y se cierra el autoclave, toda la mezcla se calienta a 110°-120° C durante un tiempo de 10 horas. Se deja enfriar y una vez fría la masa se filtra y se destila el alcohol; el residuo obtenido se trata con ácido clorhídrico concentrado y se calienta en un autoclave, durante 10 horas, a 160°-180° C. El residuo que queda en el autoclave se deja enfriar, se filtra y lava con poco agua, a continuación con algo de alcohol y finalmente se seca en la estufa. El clorhidrato de la base que se ha obtenido se presenta en forma de polvo fino, soluble en agua y de punto de fusión 195° C. Se separa de la base descomponiendo el clorhidrato con sosa, se extrae con éter y, una vez seco, se destila el éter y la base al vacío. La base se disuelve en alcohol, se añaden dos equivalentes de ácido acético por equivalente de sal y se deja la mezcla en la nevera. Al día siguiente se filtra el acetato de la base seca, en la estufa, a 50° C. La sal de penicilina se prepara a partir del acetato obtenido; se disuelve un peso dado de penicilina potásica en 10 veces su volumen de agua. A la solución obtenida se añade la mitad del peso de la penicilina de diacetato de dibencil-etilén-diamina, disuelta en su volumen de agua; al hacer la mezcla se debe agitar fuertemente. La mezcla se deja en la nevera durante un día. Se filtra y lava el residuo con acetona al 50%, luego con acetona seca y, finalmente, con éter seco. El producto se seca al vacío a la temperatura de 40° C. Se presenta en forma de un polvo amarillento.

Los autores señalan, como una circunstancia favorable de su procedimiento, el hecho de que todas las materias primas necesarias para su desarrollarlo se encuentren en España, no siendo necesario importan alguna del extranjero.

El 5 de diciembre de 1952, la empresa española *Antibióticos* S.A. presentó ante el registro de patentes tres expedientes, bastante similares entre si, destinados a proteger, por veinte años, otras tantos “Procedimiento de obtención de amino-ésteres de la penicilina”.

Los ésteres básicos de la penicilina pueden extraerse bien por reacción de una sal de penicilina con un halogenuro que contenga un grupo básico, o por reacción del anhídrido de penicilina -o un anhidro mixto de penicilina y un ácido carboxílico alifático- con un alcohol que tenga un grupo básico. En los métodos señalados es necesario aislar el halogenuro de alcohol a partir del hidro-halogenuro del haluro de alcohol, con grupo básico; esta operación presenta dificultades y proporciona bajos rendimientos³⁸¹; además, debido a la inestabilidad de los halogenuros de dietil-amino-etilo, hay que utilizarlos recién preparados.

Los investigadores adscritos a la empresa *Antibióticos* S.A. presentan tres métodos, objeto de otras tantas patentes, destinados a solventar la inestabilidad de los anhídridos de penicilina. Con escasas variaciones, los tres procedimientos registrados por *Antibióticos* S.A. tratan de la obtención de amino-ésteres de la penicilina, caracterizados porque una sal de penicilina es tratada con un hidro-halogenuro de haluro beta-dialcohol-amino-alcohol, obteniéndose así un amino-éster de penicilina que después se aísla en forma de sal, por medios conocidos.

En el primero de los métodos patentados³⁸² los autores plantean subsanar tales inconvenientes mediante un procedimiento caracterizado por tratar el hidro-halogenuro del haluro del alcohol básicamente sustituido, con un extracto, convenientemente preparado, de los caldos de cultivo que contengan penicilina: $XR_1-NH(X)(R_2)(R_3)$, [donde: X es un halógeno (por ejemplo, cloro, bromo o yodo), R_1 un radical alcohol divalente y R_2 , R_3 son radicales alcohol, aril-alcohol o parte de un sistema que forma un anillo nitrogenado]. Los autores señalan, en la memoria descriptiva, las ventajas especiales del procedimiento:

1ª. No hay que tratar la sal de penicilina cristalizada con el haluro de beta-dialcohol-amino-alcohol, sino con un extracto del caldo de fermentación, evitando de esta forma las pérdidas de sustancia, que suelen ser grandes cuando se quieren obtener penicilinas en estado comercial puro, y también los gastos que supone el empleo de costosos productos químicos y las horas de trabajo necesarias.

³⁸¹ Los autores utilizan, para justificar el mal rendimiento obtenido al lograr cloruro de dietil-amino-etil a partir de su hidrocloreto, el texto de Carl August Rojahn ampliamente versionado por Francisco Giral: Francisco GIRAL. *Productos químicos y farmacéuticos. A base de la obra ‘Preparación de productos químicos y químico-farmacéuticos’ por el Prof. C. A. [Carl August] Rojahn*. México: Atlante, 1946. 3 vols. (en la memoria se alude al vol. I: *Productos inorgánicos y compuestos alifáticos*, cf. págs. 386-387); un dato significativo para valorar la ‘presencia virtual’ de los exiliados en el desarrollo de la industria farmacéutica española.

³⁸² AHOEPM, patente 206.653; la memoria descriptiva consta de seis hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 5 de diciembre de 1952. La empresa tiene fijado su domicilio en Madrid, en el número 8 del Paseo de la Castellana. La patente, de invención, fue concedida el 13-II-1953 y hecha pública el 16-III-1953.

2ª. Se emplea un hidro-halogenuro del haluro de beta-dialcohol-amino-alcohol, que es un producto comercial. No hay necesidad de aislar el halogenuro a partir de aquel. También esta ventaja se traduce en costes económicos.

El desarrollo de este procedimiento consta de tres fases:

- Primera fase: extracción del caldo de fermentación que contenga penicilina con acetato de amilo en un medio ácido de pH *ca.* 2,2.
- Segunda fase: extracción a un pH 7,0-7,2 con una disolución *buffer*, de fosfatos, sosa o carbonato sódico.
- Tercera fase: extracción a un pH 3,5-4,0 con acetato de amilo u otros disolventes apropiados como cetonas, por ejemplo metil-etil-cetona.

El extracto obtenido puede ser tratado directamente con hidrocloreto de beta-dietil-aminoetilo.

Si al producto de la reacción se le añade una disolución etérea de cloruro de hidrógeno y, a continuación, se trata con yoduro alcalino o ácido yodhídrico, se obtiene un hidroyoduro, por ejemplo el del éster dietil-amino-etílico del ácido bencil-penicilínico³⁸³.

El segundo de los procedimientos patentados³⁸⁴ se caracteriza por tratar la sal de penicilina, bien sea metálica u orgánica, con el hidro-halogenuro del halogenuro del beta-dietil-amino-etilo, o del beta-dimetil-amino-etilo. Estos productos son obtenidos a escala comercial, sin que sea necesario liberar el halogenuro de beta-dialcohol-amino-etilo, evitándose así una serie de operaciones y el empleo de productos químicos con la desventaja de obtener un bajo rendimiento y la necesidad de prepararlo extemporáneamente.

Según este procedimiento, la sal cristalizada de penicilina se trata con el halogenuro del alcohol básicamente sustituido, de fórmula general $\text{XR}_1\text{-NH(R}_2\text{)(R}_3\text{)(X)}$, en la cual X es un halógeno, R_1 un radical alcoholilo divalente y R_2 y R_3 son radicales

³⁸³ Los autores detallan un ejemplo para ofrecer una demostración práctica del desarrollo del procedimiento: en un vaso de precipitado, provisto de agitación mecánica, se colocan 112 cm³ de un extracto metil-etil-cetónico que tiene una concentración de penicilina G (bencil-penicilina) de 85.000 U.I./cm³; se le añaden 4 g. de clorhidrato del cloruro de dietil-amino-etanol, bien en forma sólida o disuelto en una cantidad pequeña de agua; se neutraliza la disolución con hidróxido sódico 2 N. La mezcla que se obtiene se deja reaccionar, durante dos días, a una temperatura de 20°-25° C; el residuo que se forma tiene aspecto aceitoso y es ligeramente coloreado; se disuelve en 11 cm³ de alcohol etílico, se enfría con una mezcla de agua y hielo y se le añade, lentamente pero con agitación, una disolución de cloruro de hidrógeno en éter etílico, *ca.* 1,5 N, hasta conseguir una reacción ligeramente ácida. A continuación se le añade la cantidad necesaria de agua destilada para lograr la separación del líquido en dos capas; se vierte en un embudo de decantación y decanta, filtrando a un recipiente, la capa inferior acuosa, que se enfría con agua en hielo (la capa etérea se desprecia). Se agrega, gota a gota, una disolución de yoduro potásico al 10%, hasta un ligero exceso; aparece una turbidez incipiente que origina un precipitado blanco, cristalino, formado por el yodohidrato del éster penicilínico del dietil-amino-etanol. El precipitado formado se deja en reposo durante unas horas a baja temperatura; luego se filtra por succión, se escurre bien y se lava con agua de hielo. El precipitado se deseca en una estufa de vacío a temperatura inferior a 50° C. La cantidad total de producto obtenida es de 6,24 g., que representa el 66% del teórico. Su punto de fusión es de 173°-174° C. El producto cumple con las especificaciones exigidas por la *Food and Drug Administration*.

³⁸⁴ AHOEPM, patente 206.654; la memoria descriptiva consta de cinco hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 5 de diciembre de 1952. La empresa tiene fijado su domicilio en Madrid, en el número 8 del Paseo de la Castellana. La patente, de invención, fue concedida el 13-II-1953 y hecha pública el 16-III-1953.

alcohilo, arilalcohilo o parte de un sistema que forma un anillo nitrogenado. Los autores completan la memoria descriptiva con un caso práctico³⁸⁵.

El tercero de los procedimientos de esta serie³⁸⁶ se caracteriza por no tratar la sal de penicilina pura con halogenuro de beta-dialcohil-amino-alcohilo, sino con un extracto del caldo de fermentación que contenga penicilina, convenientemente preparado. El extracto del caldo de fermentación se trata con el halogenuro del alcohol básicamente sustituido, cuya formula general es: $XR_1-N(R_2)(R_3)$, donde X es un halógeno, R_1 un radical alcohilo divalente y R_2, R_3 son radicales alcohilo, arilalcohilo o parte de un sistema que forma un anillo nitrogenado.

El desarrollo de este procedimiento consiste en extraer el caldo de fermentación conteniendo penicilina con acetato de amilo en medio ácido (pH *ca.* 2,2); a continuación el acetato de amilo se neutraliza (pH 7,0-7,2) con una disolución *buffer* de fosfatos, sosa o carbonato sódico y el líquido acuoso que lleva disuelta la penicilina se acidula (hasta un pH 3,5-4,0) y se extrae con acetato de amilo u otros disolventes adecuados, como cetonas, por ejemplo metil-etil-cetona. El extracto obtenido se neutraliza; luego se trata con el cloruro de beta-dimetil-amino-etilo u otro halogenuro de dialcohil-amino-alcohilo. Al añadir al producto de la reacción una disolución etérea de cloruro de hidrógeno y después tratarlo con yoduro alcalino o con ácido yodhídrico se obtiene un hidroyoduro, por ejemplo el del éster dietil-amino-etílico del ácido bencil-penicilínico.

Los autores presentan, en la memoria descriptiva, una demostración práctica del desarrollo de este procedimiento³⁸⁷.

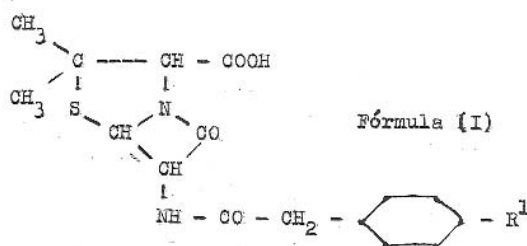
³⁸⁵ A 120 cm³ de metil-etil-cetona se le añaden 9 g. de penicilina sódica y una disolución acuosa concentrada que contenga 6 g. de clorhidrato del cloruro de dietil-amino-etanol; la mezcla resultante se neutraliza con una disolución acuosa de hidróxido sódico o carbonato sódico 2 N; se deja reaccionar durante dos días a una temperatura de 20°-25° C. La metil-etil-cetona se separa por destilación al vacío a una temperatura menor de 25° C, esta temperatura no es crítica. El residuo que se forma tiene aspecto aceitoso y es ligeramente coloreado; se disuelve en 16 cm³ de alcohol etílico, se enfría con una mezcla de agua-hielo; lentamente y agitando, se le añade una solución de cloruro de hidrógeno en éter etílico 1,5 N, hasta conseguir reacción ácida. Para lograr la separación del líquido en dos capas, se echa en un embudo de decantación; se despreja la capa etérea y la capa inferior acuosa se filtra a un recipiente adecuado y se enfría en un baño de hielo; a continuación se le agrega, gota a gota hasta un ligero exceso, agitando mecánicamente, una solución acuosa de yoduro potásico al 10%. Primeramente se forma una turbidez, que origina un precipitado blanco cristalino de yodo-hidrato del éster penicilínico de dietil-amino-etanol; este precipitado se deja reposar a baja temperatura durante unas horas; luego se filtra por succión en un embudo Buchner, se deja que escurra y se lava con agua de hielo. El precipitado se deseca en una estufa de vacío a una temperatura inferior a 50° C. Se obtienen 9,22 g. de producto, lo que represente el 65% del teórico; el punto de fusión es 173°-174° C; el producto cumple con las especificaciones exigidas por la *Food and Drug Administration*.

³⁸⁶ AHOEPM, patente 206.655; la memoria descriptiva consta de cinco hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 5 de diciembre de 1952. La empresa tiene fijado su domicilio en Madrid, en el número 8 del Paseo de la Castellana. La patente, de invención, fue concedida el 13-II-1953 y hecha pública el 16-III-1953.

³⁸⁷ Un volumen de 238 cm³ de extracto metil-etil-cetónico de un caldo de cultivo que contenga penicilina y cuya concentración sea unas 80.000 U.I./ml. se neutraliza (pH *ca.* 7) con una disolución de hidróxido o carbonato sódico 2 N; se le añaden 5,4 g. de cloruro de dietil-amino-etanol. La mezcla se deja en reacción durante dos días, con agitación, a una temperatura de 20°-25° C; el residuo que se forma, que tiene aspecto aceitoso y es ligeramente coloreado, se disuelve en 20 cm³ de alcohol etílico, se enfría exteriormente con agua de hielo y se le añade, poco a poco y agitando, una solución 1,4 N de cloruro de hidrógeno en éter etílico, hasta conseguir una reacción ligeramente ácida; a continuación se le añade la cantidad necesaria de agua destilada para lograr la separación del líquido en dos capas. Se vierte en un

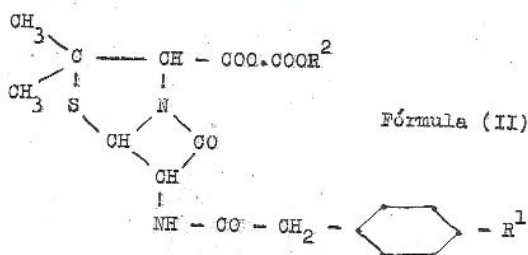
Con fecha 27 de febrero de 1953, la empresa inglesa *Glaxo Laboratories Limited* presenta, ante el registro español de patentes, una solicitud para proteger, por veinte años, su invención relativa a “Un procedimiento para la preparación de nuevos derivados de penicilina”³⁸⁸ que permitan mantener una alta concentración efectiva de penicilina en determinadas partes del cuerpo; se trata del éster dietil-amino-etílico de la penicilina.

El nuevo método propuesto por los investigadores de *Glaxo Laboratories Limited* se basa en el empleo, como compuestos intermedios, de productos que se preparan por la reacción de un éster clorofórmico sobre una sal de penicilina, se transforman en un éster de penicilina al tratarlos con un compuesto hidroxílico en condiciones básicas, o en una amida tratándolos con una amina primaria o secundaria.



Fórmula I. Penicilina.

R¹ representa un hidrogeno en caso de la penicilina G, o un grupo hidroxilo en el caso de la penicilina X.



Fórmula II. Producto utilizado en este procedimiento.

R¹ representa un hidrógeno en caso de la penicilina G, o un grupo hidroxilo en el caso de la penicilina X.

R² es un grupo alcoholilo, aralcoholilo o arilo.

Para obtener tales productos se hacen reaccionar compuestos de fórmula general (I) con dietil-amino-etanol en un disolvente inerte. En la conversión de penicilina en uno de sus ésteres o una de sus amidas, de acuerdo con los autores de este procedimiento, no es necesario que se aisle el compuesto intermedio; los compuestos

embudo de decantación; se filtra a un recipiente la capa inferior acuosa y se enfría en un baño de hielo; la capa etérea se elimina. Después se añade, gota a gota hasta un ligero exceso, agitando mecánicamente, una solución de yoduro potásico al 10%; se forma una turbidez que origina un precipitado blanco, cristalino, formado por hidro-yoduro del éster penicilínico del dietil-amino-etanol. Este precipitado se deja en reposo durante unas horas a baja temperatura y luego se filtra por succión en un embudo Buchner, se deja escurrir y se lava con agua de hielo. El precipitado se seca en una estufa de vacío a temperatura inferior a 50° C. Se obtiene una cantidad de 12,28 g. de producto, es decir el 65% del teórico, cuyo punto de fusión es 173°-174° C., y que cumple con las especificaciones exigidas por la *Food and Drug Administration*.

³⁸⁸ AHOEPM, patente 208.018; la memoria descriptiva consta de veinticinco hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras, fechada en Madrid, a 1 de junio 1955; como domicilio de la empresa figura Greenford Road, Middlesex (Inglaterra). Esta solicitud se corresponde con la presentada en Gran Bretaña el 29 de febrero de 1952 bajo el número 5.384/52. La patente española fue concedida el 2-IX-1953 y hecha pública el 1-XI-1953.

deseados pueden obtenerse haciendo reaccionar la sal de penicilina en un disolvente con el éster clorofórmico y adicionando a continuación, en el caso de ésteres, el compuesto hidroxílico en condiciones básicas o, si se trata de las amidas, amina primaria o secundaria. Cualquier sal adecuada de penicilina puede usarse en el proceso, tanto si es orgánica o metálica; quedan excluidas las aminas primarias, ya que por tener partes básicas, pueden reaccionar con el anhídrido. Los autores recomiendan utilizar sales de penicilina de amina terciarias, como por ejemplo, trietil-amina y N-etil-piperidina.

Los disolventes que se emplean en la formación de los nuevos compuestos de fórmula general (II) son inertes frente a los reactivos. Una nueva recomendación que hacen los autores es que, en caso de emplearse sales de penicilina derivadas de orgánicas, es preferible utilizar disolventes como cloroformo, acetato de etilo, acetona o éter, y si se utilizan sales metálicas, el disolvente conviene que sea miscible en agua, por ejemplo, acetona o dioxanos. Además, es preferible que tales disolventes no contengan más de un 30% de agua. Los procesos que se han descrito pueden ser realizados a temperaturas entre -20° y 60° C, siendo una temperatura conveniente y adecuada la de ca. 0° C.

Para formar los ésteres señalados en este procedimiento se añade el compuesto hidroxílico en condiciones básicas, lo que se cumple bien por la presencia de una amina terciaria bien por el empleo de un compuesto hidroxílico que contenga un grupo amino terciario³⁸⁹. Los ésteres y amidas preparados según este procedimiento pueden aislarse de la mezcla de reacción por uno de estos tres medios³⁹⁰:

1. Ésteres y amidas neutros. Una solución en disolvente no acuoso, o un extracto clorofórmico de la solución acuosa, al objeto de separar el exceso de base, se lava con una solución tampón de citrato (pH 2) y con otra solución tampón de fosfato (pH 8,0), con lo cual se separa la penicilina no transformada. La solución se seca y el disolvente se separa por destilación.

2. Ésteres y amidas básicos. La solución de los reactivos que se encuentran disueltos en un disolvente no miscible con agua se trata con una solución tampón de fosfatos (pH 8,0), se lava y seca. De la solución se separa el disolvente por destilación y el residuo obtenido se disuelve con acetona u otro disolvente adecuado. Precipita la amida o el éster básico en forma de haluro de hidrógeno.

3. Ésteres y amidas ácidos. La solución de reactivos en un disolvente orgánico no miscible en agua se extrae con una solución de bicarbonato sódico; se acidula la fase acuosa, se extrae con un disolvente orgánico adecuado, el extracto orgánico se seca y, por destilación, se separa el disolvente.

³⁸⁹ Como ejemplo de aminas terciarias adecuadas para crear las condiciones básicas, los autores señalan piridina, anilina di-metílica y trietil-amina.

³⁹⁰ Una quincena de ejemplos completan esta memoria descriptiva; nos ocupamos aquí del primero de ellos: a una cantidad de 1,9 g. de la sal trietil-amónica de bencil-penicilina, en 10 cm³ de cloroformo sin alcohol, se le adicionó, a 0° C, una solución formada por 0,475 g. de cloro-formiato disueltos en 5 cm³ de cloroformo, agitando durante 10 minutos; se forma una solución transparente e incolora, a esta solución se le adicionó una cantidad de 10 cm³ de metanol, que contenía unas gotas de piridina; se observa un ligero desprendimiento de dióxido de carbono. Se deja en reposo a 0° C durante una hora y, a continuación, esta mezcla reactiva se vertió en una gran cantidad de agua, extrayéndose con cloroformo; el extracto de cloroformo se lavó con un tampón de citrato de pH 2 y, a continuación, se hicieron dos lavados con un tampón de fosfato de pH 7,8. Se secó y se extrajo el cloroformo mediante destilación a presión reducida, obteniéndose un sólido blanco (0,81g.); la nueva cristalización del producto, por medio de tetracloruro de carbono, originó el éster metílico puro; la cantidad obtenida fue de 0,51 g., el punto de fusión quedó establecido en 96,5°-97,5° C.

El 27 de mayo de 1953 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, esta vez a través de su propietario único Kund Abildgaard-Elling (1901-1986)³⁹¹, presenta ante el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a “Un procedimiento para la preparación de ésteres de penicilina”³⁹² desarrollado por dos investigadores adscritos a esta empresa, ambos de nacionalidad danesa: Wang Ole Godtfredsen y Erling Juhl Nielsen³⁹³.

El procedimiento se refiere a la producción de ésteres de penicilina con alcoholes que poseen un grupo secundario de aminas y sales de estos ésteres; estos productos tienen la misma actividad antibiótica que la penicilina y la propiedad específica de acumularse en los tejidos pulmonares, con lo que la concentración de penicilina en estos tejidos es mucho mayor que en sangre.

Estos ésteres, en estado libre, son en la mayoría de los casos aceites viscosos y sus sales son amorfas o cristalinas. Con algunos ácidos, como ácido hidroyódico, ácido sulfanílico y ácido metanílico, forman sales poco solubles; si estas sales se usan para fines terapéuticos, pueden obtenerse efectos de penicilina prolongados.

Los compuestos a los que alude este procedimiento tienen por fórmula general: $\text{PCOO-R}_1\text{-NH-R}_2$; donde PCOO representa el anión de penicilina, R_1 un grupo de alquilo divalente³⁹⁴ y R_2 un grupo alquilo, un grupo cicloalifático monovalente o un grupo de aralquilo³⁹⁵. La penicilina que forma parte de la molécula es, preferentemente, bencil-penicilina (penicilina G), pero puede ser de cualquier otra clase o mezcla de varias penicilinas³⁹⁶.

Estos ésteres de penicilina se obtienen por la reacción de una sal de penicilina con un compuesto que posea la fórmula general: $\text{X-R}_1\text{-NH-R}_2$, en la cual X represente un átomo de halógeno y R_1 y R_2 tienen el significado antes indicado. Si después se

³⁹¹ Cf. LEO. *Leo-Pharma time life*. Leo: Corporated communications, 2010 [www.leo-pharma.us].

³⁹² AHOEPM, patente 209.522; la memoria descriptiva consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 27 de mayo de 1953, por Francisco García Cabrerizo, representando a Knud Abildgaard-Elling. El procedimiento había sido registro ante la Administración danesa, con fecha de 28 de mayo de 1952, bajo el número de registro 1.705/53. La patente española fue concedida el 24-V-1954 y hecha pública el 1-VII-1954.

³⁹³ La memoria descriptiva nos permite conocer sus domicilios: Wang Ole Godtfredsen es residente en 14, C, Naesbyholmvej (Copenhagen) y Erling Juhl Nielsen en 7, Vernersvej (Charlottenlund).

³⁹⁴ El grupo R_1 puede tener una cadena recta o ramificada; preferentemente no contiene más de ocho átomos de carbono. Los compuestos en los cuales R_1 contiene dos, tres o cuatro átomos de carbono que forman una cadena recta entre uno de los átomos de oxígeno y el átomo de nitrógeno, es decir grupo etilo, propilo o butilo, con o sin sustituyentes, son muy adecuados para ejercer una acumulación de penicilina en los tejidos pulmonares.

³⁹⁵ El grupo R_2 puede contener una cadena corta o larga de átomos de carbono, que puede ser ramificado o bien formar un anillo.

³⁹⁶ Los autores citan ejemplos de compuestos que pueden incluirse dentro de la esencia de esta invención; entre ellos mencionan los siguientes ésteres de penicilina: éster metilo-amino-etilo, etilo-amino-etilo, propilo-amino-etilo, isopropilo-amino-etilo, butilo-amino-etilo, butilo-amino secundario, butilo-amino-etilo terciario, ciclo-pentilo-amino-etilo, ciclo-hexilo-amino-etilo y los correspondientes ésteres, en los cuales el grupo etilo, en uno o en ambos átomos de carbono, están sustituidos por grupos de alquilo que poseen 1-3 átomos de carbono, así como los ésteres en los cuales el grupo etilo ha sido reemplazado por un grupo de propilo o butilo que, asimismo, puede ser sustituido por un alquilo que posee 1-3 átomos de carbono.

desea obtener una sal del éster que se ha sintetizado, éste se hace reaccionar con un ácido inorgánico u orgánico, según proceda.

La sal de penicilina empleada en la reacción puede ser una sal alcalina, por ejemplo la sal de potasio o de amonio, o de un metal alcalino-térreo como podía ser la sal de calcio, de bario, de plata o una sal de penicilina con una amina terciaria, por ejemplo la sal de procaína, etil-amina o N-etil-piperidina. El halógeno que se encuentra en el compuesto de este elemento, el cual reacciona con la sal de penicilina, es cloro, bromo o yodo; por razones de estabilidad, los cloruros son preferidos en la mayoría de los casos. La reacción se efectúa mezclando los reactivos en un disolvente orgánico en el cual resulta soluble el éster deseado; como disolvente puede utilizarse un alcohol alifático de pocos átomos de carbono -como metanol, etanol o isopropanol-, una cetona -por ejemplo acetona, etil-metil-cetona o di-isopropil-cetona- o un hidrocarburo -como benceno, tolueno o xileno-, un hidrocarburo clorado -como cloroformo o tetracloruro de carbono- u otro disolvente orgánico -como dimetil-amida o tetrahidro-furano-.

La reacción entre la sal de penicilina y el compuesto de halógeno se lleva a cabo por la acción de disolver o suspender la sal de penicilina dentro del disolvente empleado y agregando a esta solución el compuesto de halógeno, ya que estos compuestos, en la mayoría de los casos, son inestables y tienen tendencia a polimerizar, generalmente es necesario un exceso del 5% al 10% de compuesto halogenado para conseguir la conversión completa de la penicilina³⁹⁷. Por norma, la sal formada a partir del catión de la sal de penicilina y el halógeno es insoluble en el disolvente empleado y puede ser separada por filtración. A continuación puede obtenerse el éster de penicilina, en forma de un aceite viscoso, por la concentración del filtrado en vacío, por refrigeración o por una combinación de ambos medios. En la mayoría de los casos se prefiere obtener el éster en forma de su sal, con un ácido inorgánico u orgánico³⁹⁸.

Al obtener las sales de los ésteres, el filtrado de la sal formada por el catión de la sal de penicilina y el halógeno se puede neutralizar directamente con la cantidad calculada del ácido en cuestión y aislar la deseada sal de la solución por concentración de la misma, o por la adición de un disolvente en el cual la sal es insoluble o poco soluble. Al producirse las sales poco solubles de los ésteres, por ejemplo hidro-yoduro, el yoduro de hidrógeno se puede añadir directamente al citado filtrado. Estas sales de los ésteres se pueden producir por la precipitación de una solución acuosa de una de las sales solubles del éster con una solución de un yoduro soluble en agua.

Los autores realizan una serie de pruebas biológicas para determinar la capacidad de las nuevas sustancias para acumularse en el tejido pulmonar³⁹⁹. Termina la

³⁹⁷ Si la reacción no se inicia inmediatamente después de la referida adición, o por lo menos tras vibración o agitación de la mezcla, se pueden emplear temperaturas elevadas, hasta de 100° C, en tales casos conviene que la reacción se lleva a cabo por cocción con reflujo.

³⁹⁸ Los ácidos empleados para este fin son: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láurico, ácido p-amino-benzoico, ácido p-amino-salicílico, ácido acetil-salicílico, ácido succínico, ácido tartárico, así como penicilina y los ácidos citados con los cuales los ésteres forman sales poco solubles, que son: ácido hidro-yódico, ácido sulfanílico y ácido metanílico.

³⁹⁹ Los animales de ensayo fueron ratas adultas, divididas en grupos de cinco ratas; a cada rata se le aplicó una inyección subcutánea de 10.000 U.I. en forma de hidro-yoduro de bencil-penicilina-isopropil-amino-etil-éster disuelto en 1 ml. Al cabo de media hora después de la inyección se sacrificaron las ratas del primer grupo y se determinó la concentración de penicilina en el tejido pulmonar; con los otros grupos de ratas se hicieron las determinaciones correspondientes, una, dos, tres, cuatro y ocho horas,

memoria con media decena de ejemplos sobre la preparación de las sustancias que en ella se proponen⁴⁰⁰.

El 16 de junio de 1953, el *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)* presenta, ante el registro de patentes, una solicitud para proteger, por diez años, una patente de introducción relativa a “Un nuevo procedimiento de obtención de una sal estable de penicilina”⁴⁰¹; éste permite obtener una sal de penicilina estable, que se mantiene sin alteración a temperaturas de 100° C y que por su gran insolubilidad puede utilizarse en todas las formas farmacéuticas imaginables (inyectables, comprimidos, jarabes etc.); por su falta de sabor, se pueden administrar por vía oral sin el menor inconveniente y su gran insolubilidad en agua permite que pueda ser empleada para la valoración de penicilina en medios acuosos. El procedimiento, sencillo y económico, se caracteriza por asociar la penicilina al clorhidrato de bis-(fenil-metilén-amino)-etano.

En primer lugar se prepara una disolución de diclorohidrato de bis-(fenil-metilén-amino)-etano en la concentración y temperatura a la que haya de mezclarse con la penicilina, sin que exceda de su propio factor de solubilidad. Simultáneamente se prepara una solución de penicilina, que puede ser bien una penicilina G sódica, una penicilina G N-etil-piperidínica en agua, una penicilina ácida no inactivada en *buffer* (amortiguador de acidez) o cualquier sal soluble de penicilina. Es preciso que esta solución tenga un pH comprendido entre dos valores extremos: no debe ser tan alto que libere el bis-(fenil-metilén-amino)-etano en forma de base libre ni tan bajo que inactive o haga precipitar la penicilina. La concentración de la solución ha de ser tal que, al

respectivamente, después de la inyección. Los resultados muestran la acumulación de penicilina en pulmón.

Los inventores realizaron ensayos similares con cobayas adultos, empleando esta vez dosis de 25.000 U.I. de penicilina en forma de hidro-yoduro de éster de bencil-penicilina-isopropil-amino-etilo suspendido en 1 ml. de agua. Los resultados obtenidos muestran los mismos efectos.

Por último, realizaron una serie de ensayos utilizando conejos adultos como animales de experimentación, y dosis de 100.000 U.I. de la misma sal de penicilina que se utilizó en las pruebas anteriores, suspendidas en 2 ml. de agua, que reinyectaron intramuscularmente. Las concentraciones de penicilina se midieron media hora, una, dos y cuatro horas después de la inyección, volviendo a determinarse acumulación significativa de penicilina en tejido pulmonar.

⁴⁰⁰ Comentamos el primero de ellos: se suspendieron 35,3 g. de sal potásica de penicilina en 200 ml. de isopropanol, y se añadieron a la suspensión 12,7 g. de cloruro de beta-isopropil-amino-etilo. El compuesto halogenado se emplea en exceso, pues posee una gran capacidad a dimerizar. Se separa por filtración el cloruro de potasio y el compuesto halogenado dimerizado. Hechas estas operaciones, resulta un filtrado del cual se obtiene el éster de penicilina-beta-isopropil-amino-etilo en forma de aceite, por refrigeración fuerte de la solución o por evaporación del disolvente al vacío. A este filtrado se le añaden 200 ml. de una solución al 10% de ácido cítrico en acetona y, a continuación, 1.000 ml. de éter, se precipita el citrato del éster en forma de una sustancia blanca amorfa. El citrato se convierte en el correspondiente hidro-yoduro disolviéndolo en agua y agregando la cantidad calculada de una solución acuosa de yoduro de potasio. Se deja reposar la solución durante media hora a una temperatura de 0°-5° C, y se forma un precipitado cristalino del hidro-yoduro del éster de penicilina-beta-isopropil-amino-etilo. La cantidad obtenida de hidro-yoduro del éster es de 28 g.; el hidro-yoduro se vuelve a cristalizar por disolución en una mezcla de partes iguales de metanol e isopropanol, añadiendo 1,5% de volumen en éter. El producto así obtenido se funde a 153°-154° C, descomponiéndose.

⁴⁰¹ AHOEPM, patente 209.812; la memoria descriptiva consta de cinco páginas, escritas a máquina por una sola de sus caras y firmada en Madrid, a 6 junio de 1953. La empresa consta como domiciliada en Madrid, en el número 25 de la calle Alcalá. La patente fue concedida con fecha 5-I-1954 y hecha pública el 16-II-1954.

mezclarla con la solución de diclorhidrato de bis-(fenil-metilén-amino)-etano, la mezcla exceda, a la temperatura a la cual se trabaja, del factor de solubilidad del conjunto.

Obtenidas y graduadas las dos soluciones, son mezcladas, añadiendo la primera a la segunda o la segunda a la primera, con o sin agitación, pero respetando la temperatura que se haya determinado y que, para trabajar con ella, ya se han hecho los cálculos de las dos concentraciones, obteniéndose por precipitación la sal bis-(fenil-metilén-amino)-etano de penicilina. Esta sal se separa de los líquidos disolventes bien por filtración, centrifugación, decantación o cualquier otro procedimiento o combinación de procedimientos conocidos. Si se desea obtener el producto muy puro, se somete a lavado con agua o con un disolvente orgánico, hasta conseguir el grado de pureza deseado. Por último, el producto húmedo se seca, bien por desecación espontánea a la temperatura ambiente o bien en estufa de desecación, en estufa de vacío, por liofilización o cualquier otro medio adecuado conocido.

En resumen, un nuevo procedimiento de obtención de una sal estable de penicilina, que se caracteriza esencialmente porque una solución de penicilina se mezcla con una solución de diclorhidrato de bis-(fenil-metilén-amino)-etano, teniendo en cuenta que esta última solución tenga una concentración tal que, a la temperatura de trabajo, no exceda su propio factor de solubilidad y que la concentración de la penicilina sea tal que, cuando se adicione a la solución del diclorhidrato de bis-(fenil-metilén-amino)-etano, no se exceda el factor de solubilidad del conjunto y que el pH de la solución resultante se encuentre entre dos niveles, de forma que el máximo no sea tan alto que libere al bis-(fenil-etilén-amino)-etano en forma de base libre, ni que el mínimo sea tan bajo que inactive o precipite la penicilina.

El 26 de agosto de 1953 la empresa británica *Glaxo Laboratories Limited* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, “Un procedimiento par la preparación de una nueva sal de penicilina G”⁴⁰², destinada a mantener prolongadas concentraciones de penicilina en sangre; se trata de la combinación de N-bencil-beta-fenil-etil-amina con penicilina.

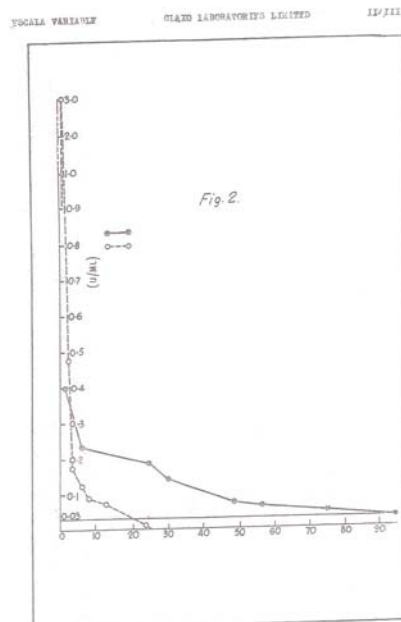
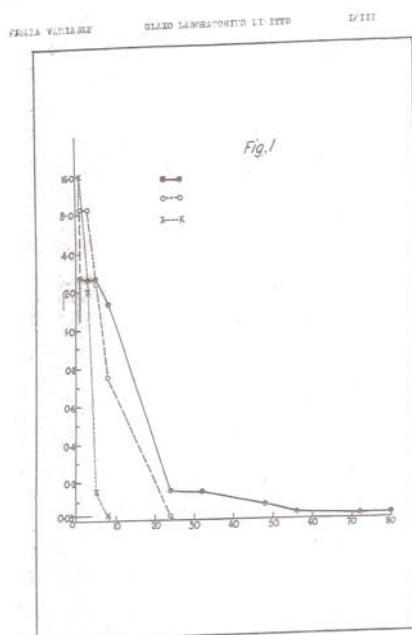
Los ensayos realizados demuestran que, administrada por vía oral, proporciona una prolongación aumentada de los niveles terapéuticos de penicilina en sangre en comparación con procaína-penicilina, aunque las pruebas de niveles en sangre, después de una administración por vía oral, están sujetas a grandes variaciones. La nueva sal es aceptada por el paladar mejor que cualquier penicilina sódica, potásica o de procaína; la toxicidad que presenta es escasa y ligeramente más pequeña que la de la procaína-penicilina. La base, N-bencil-beta-fenil-etil-amina, es fácilmente disponible, por lo que la producción de la nueva sal es industrial. La estabilidad que posee la convierte en un aditamento útil como suplemento en los piensos. Las características del nuevo compuesto en su fase más pura, a efectos de su identificación, son las siguientes: sólido cristalino blanco, punto de fusión 146°, [alfa] 20°/D = 122° [en cloroformo], potencia teórica: 1.090 U.I./mg., potencia en bioanálisis [empleando *Sarcina lutea* como

⁴⁰² AHOEPM, patente 211.030; la memoria descriptiva consta veinte hojas mecanografiadas por una sola de sus caras, firmada en Madrid a 26 de agosto de 1953. La empresa figura como establecida en Geenford, Middlesex (Inglaterra). El expediente se corresponde con el presentado en Gran Bretaña el 27 de agosto de 1952, bajo el número 21.553/52. La patente española fue concedida el 27-XI-1953 y publicada el 1-I-1954.

organismo de ensayo] 1.020 U.I./mg., solubilidad a 20°-25° C [en bioanálisis de solución acuosa saturada] 0,107 peso/volumen.

En la memoria se presentan los experimentos realizados, en conejos, para determinar el nivel de penicilina en la sangre de estos animales, tras la administración del nuevo producto, después de tiempos distintos de inyección; los conejos empleados pesaron aproximadamente 2,5 kg. cada uno y, en todos los casos, fueron inyectados por vía intramuscular con 100 mg. de la nueva sal en 1 ml. de suspensión acuosa; los resultados obtenidos, y los de experimentos comparativos empleando 100 mg./ml. de suspensión acuosa de procaína-penicilina G, muestran la mayor utilidad de esta nueva sal. En otro experimento, 100 mg. de esta nueva sal se inyectaron intramuscularmente a un determinado número de conejos de 2,5 kg.; lo inyectado estaba contenido en 1 ml. de agua destilada a la que se le agregó mono-oleato polioxi-etilénico; las muestras de sangre, extraídas a intervalos, fueron estimadas por bioanálisis. Los datos prueban la mayor permanencia en sangre del nuevo compuesto (figura 1).

Realizados exitosamente los experimentos con conejos, se efectuaron con humanos: se inyectó a cada paciente, por vía intramuscular, 1 ml. de suspensión acuosa de la nueva sal, que contenía 300.0000 U.I.; la mayor parte de los inyectados no relataron haber sufrido dolores durante la inyección, ni hubo notificaciones de reacciones subsiguientes; las tomas de muestras de sangre se hicieron por punción en el dedo, a intervalos después de la inyección; las titulaciones de la penicilina se realizaron por bioanálisis, empleando *Sarcina lutea* como organismo de ensayo. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de inyección de procaína-penicilina, obteniéndose que la inyección de la nueva sal en agua proporciona prolongados niveles en sangre, en comparación con la procaína-penicilina inyectada en agua (figura 2).



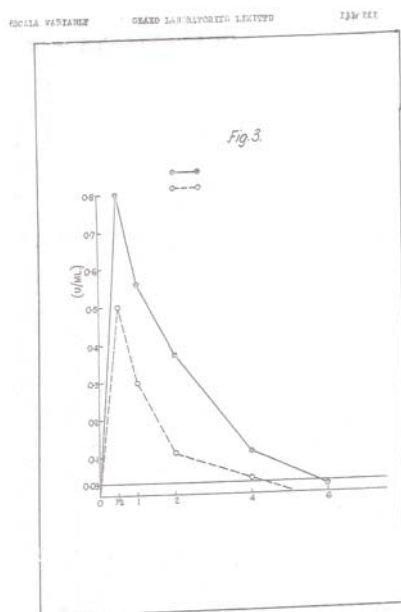


Figura 1. Estudios experimentales en conejos. Inyección intramuscular.

Figura 2. Estudios experimentales en humanos. Inyección intramuscular.

Figura 3. Estudios experimentales en humanos. Administración oral.

Las abscisas se refieren al tiempo en horas y las coordenadas al nivel de penicilina en sangre expresado en U.I./ml.

Las líneas de trazado lleno se refieren a la sal de beta-fenil-etil-bencil-amina, la curva de trazos mayores se refiere a la sal de procaína y la curva de trazos más pequeños, o de puntos, se refiere a la sal sódica.

Por último, se realizaron experimentos de administración oral en humanos. Se llevaron a cabo dos experimentos separados: en el primero se empleó una mezcla aromatizada que contenía 400.000 U.I. en 10 ml.; el material no presentaba un sabor desagradable, solamente un ligero regusto poco grato; a cada uno de los 7 voluntarios se les administró 10 ml. (400.000 U.I.) en cada dosis, a una hora después del desayuno; los niveles de penicilina en sangre fueron estimados por bioanálisis. El segundo experimento fue similar al primero, con la salvedad de que la mezcla contenía las dosis de 2.400.000 U.I. en 1 ml., ensayándose al mismo tiempo una mezcla de aromatización comparable de procaína-penicilina (figura 3).

Los ensayos sobre toxicidad demuestran que esta nueva sal es un poco menos tóxica que la procaína-penicilina G; el DL 50 de dicha sal, aplicada intramuscularmente en ratones, fue de 170 mgr/kg., mientras que el de procaína-penicilina fue de 134 mg./kg., en las mismas condiciones.

El método de preparación de la nueva sal de penicilina G consiste en poner en contacto iones de penicilina G con iones de N-bencil-beta-fenil-etil-amina en solución en un disolvente, en el cual la sal deseada sea relativamente insoluble, mientras que los materiales de partida son más solubles que la sal; se puede hacer reaccionar penicilina libre con N-bencil-beta-fenil-etil-amina en un disolvente, en el cual la sal nueva sea insoluble, pero donde la base y la penicilina G sean solubles; o bien, una sal de penicilina G, por ejemplo una sal de metal alcalino, puede reaccionar con una sal de la base, por ejemplo hidrócloruro, en un disolvente, en el cual la sal de penicilina G y la sal de la base sean solubles, pero donde la nueva sal es insoluble.

No es preciso emplear penicilina G pura para la preparación de esta nueva sal pues el propio proceso de preparación da lugar a una purificación; así, por ejemplo, puede prepararse la nueva sal a partir de una solución de penicilina G impurificada, tal y como los extractos alcalinos tamponados, extractos en disolvente y aguas madre de cristalización de la penicilina⁴⁰³. Para la reacción entre una sal de penicilina G y una sal

⁴⁰³ Ejemplos de disolventes adecuados para la reacción entre la penicilina G libre y la base libre son: t-butanol, acetona y los acetatos etílico, butílico y amílico.

de la base, los autores indican la conveniencia de utilizar sales acuosolubles como reactivos iniciales y emplear agua como disolvente; el pH debe hallarse preferiblemente en las proximidades del neutro⁴⁰⁴.

En definitiva, los autores presentan un procedimiento para obtener una sal de penicilina G, en el cual iones de penicilina G se ponen en contacto con iones de N-bencil-beta-fenil-etil-amina en un disolvente; la nueva sal que se obtiene es relativamente insoluble, mientras que los reactivos iniciales son más solubles que dicha sal, por lo que la nueva sal precipita de la solución y con ello se recupera.

Con fecha 19 de noviembre de 1953, la empresa norteamericana *Bristol Laboratories* Inc. presentó, ante el registro español, una solicitud de patente de introducción, por diez años, destinada a proteger “Un método para preparar sales de penicilina”⁴⁰⁵. El procedimiento se refiere a una nueva sal de amina de penicilina, que tiene la siguiente fórmula: $[(C_6H_5C_2H_2)-NH].Pen$ [Pen alude a un radical de penicilina ácido o una mitad activa del mismo, capaz de formar una sal adicional con dibencil-amina].

El autor explica su patente de introducción mediante un par de ejemplos: en el primero, una cantidad de 2,3 cc. de HCl se añade a 0.66 g. de dibencil-amina contenidos en 10 cc. de agua, para obtener un mol adicional de dibencil-amina; por otra parte se agregan 1,32 g. de penicilina G sódica a 40 cc. de agua, obteniéndose así una solución de 51.550 U.I./cc. de penicilina G sódica. Se unen ambas soluciones y se forma 1,62 g. de un precipitado cristalino, blanco, con una potencia de 713 U.I./mg.

En el segundo ejemplo, una cantidad de 0,19 g. de dibencil-amina se agrega a 0,8 cc. de HCl 1N y 1 cc. de agua; a la mezcla resultante se añaden 0.66 g. de penicilina G sódica en 20 cc. de agua. Al enfriarla, se obtuvo un precipitado blanco, que fue filtrado y secado al vacío, obteniéndose la sal cristalina de penicilina G de dibencil-amina con una potencia de 1.075 U.I./mg.

En la memoria se señala que, aunque el método ha sido descrito con referencia a las sales adicionales de dibencil-amina de penicilina G, quedan incluidas en la patente las sales de dibencil-amina de otras penicilinas, tanto las naturales, tales como las penicilinas G y F, como las sintéticas. Añade que la reacción se puede llevar a cabo en disolventes distintos del éter, como podían ser butanol, propanol o acetato amílico.

⁴⁰⁴ Para mejor comprensión del procedimiento, los autores ofrecen media docena de ejemplos ilustrativos de los diversos métodos de preparación de esta nueva sal; comentamos el primero de ellos: una solución de penicilina sódica (7,8 g.) en agua (50 cm³), fue acidulada a pH 2 con ácido clorhídrico diluido; la penicilina libre que se ha formado se extrae con etil-acetato (50 cm³). La capa orgánica fue secada rápidamente con sulfato magnésico; se agrega, a continuación, a una solución de bencil-beta-fenil-etil-amina (5 g.) en etil-acetato (20 cm³). La cristalización de la sal ocurrió espontáneamente, en forma de placas incolores (12,1 g.), con punto de fusión 146°-147° C, $[\alpha]_{20}^D = 122^\circ$ [en cloroformo]; análisis centesimal del compuesto: C₃₁H₃₅O₄N₃S; N: 7,8 (hallado), 7,7 (teórico).

⁴⁰⁵ AHOEPM, patente 212.261; la memoria descriptiva consta de cuatro hojas, escritas a máquina; como domicilio social de la empresa figura Thompson Road, Syracuse 1 (Nueva York, EE.UU.). La memoria fue firmada, en Madrid, el 19 de noviembre de 1953; está basada en la patente norteamericana número 2.585.432, expedida el 12 de febrero de 1952. La patente fue concedida con fecha 20-I-1955 y publicada el 1-II-1955.

El 23 de enero de 1954 es una firma española, *Laboratorios del Dr. Esteve S.A.*, quien presenta a registro su solicitud de protección, por veinte años, para una patente de invención relativa a un “Procedimiento para preparar la N,N’-dibencil-etileno-diamina-dipenicilina G”⁴⁰⁶, un derivado de la penicilina G, de acción terapéutica, en que esta sustancia se combina con N,N’-dibencil-etilén-diamina para formar un compuesto definido, en la proporción de un mol de este compuesto con dos moles de penicilina.

La técnica operatoria consiste en obtener una solución, en un mismo disolvente, de cada una de las sustancias que han de reaccionar: la penicilina en la forma de ácido y la N,N’-dibencil-etileno-diamina que tiene carácter básico. Es imprescindible que el disolvente usado sea tal que en él se disuelvan ambas sustancias, pero que el producto de la combinación, es decir, la N,N’-dibencil-etileno-diamina-dipenicilina, sea poco soluble, con lo que se separa con facilidad de las aguas madre⁴⁰⁷.

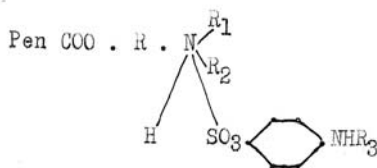
Los autores detallan su técnica operativa, así como las cantidades de sustancias reaccionantes apropiadas, mediante el siguiente caso práctico: se colocan en un embudo de decantación 37,21 g. de penicilina G potásica completamente secos y se disuelven en agua destilada; la disolución se mantiene a baja temperatura y se va añadiendo ácido fosfórico diluido hasta que la solución alcance un pH de 2,7; la penicilina queda en forma de ácido libre, que se extrae en el mismo embudo con acetato de amilo. Se juntan todas las porciones del extracto y se desecan con sulfato sódico anhidro, se separa la penicilina ácida, por decantación, en un matraz adecuado, provisto de un agitador mecánico. Sobre la solución de penicilina ácida, y agitando constantemente, se añade, gota agota, una solución de 24 g. de N,N’-dibencil-etileno-diamina en acetato de amilo anhidro; cuando se ha terminado la adición, se deja el recipiente durante varias horas en el frigorífico, a una temperatura de 5 ° C, luego se filtra a través de un embudo Büchner con una fuerte succión y el sólido que se obtiene se lava con acetona y con éter anhidro. Se introduce rápidamente en la estufa de vacío y se deseca a 45 ° C, hasta obtener un producto que tenga menos del 8% de humedad; en estas condiciones su potencia como antibiótico es del orden de 1.200 U.I./mg. De acuerdo con el uso que se le vaya a dar al preparado o la forma en que haya de ser administrado, así será el tamaño de las partículas; estas variaciones en el estado físico pueden lograrse por disolución de la sustancia en mezclas de agua y disolventes apropiados, en proporciones que favorezcan la cristalización adecuada. La disolución se logra, por calefacción, a 50° C y la cristalización, por enfriamiento, a 5 ° C.

El 6 de febrero de 1954, el danés Knud Abildgaard-Elling (1901-1986), propietario de la empresa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presenta, ante el registro español de patentes, el expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a “Un método de producir sales de ésteres de penicilina poco solubles en

⁴⁰⁶ AHOEPM, patente 213.291; la memoria descriptiva consta de cuatro hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola cara, fechadas en Madrid, a 23 de enero de 1954. La razón social de esta empresa se encuentra en Barcelona, avenida de la Virgen de Montserrat, 209. La patente fue concedida el 22-V-1954 y publicada el 1-VII-1954. Pese al origen español de la empresa, ésta se acoge a la prioridad de la patente portuguesa 30.503, de 13 de mayo de 1953; es probable que con los *Laboratorios Atral L^{tda}* de Lisboa, con quien, pocos meses después, el 11-IX-1954, presentarán una invención conjunta (cf. AHOEPM, patente 217.456).

⁴⁰⁷ Compuestos adecuados para este fin son el acetato de amilo, de butilo y el éter sulfúrico.

agua⁴⁰⁸, debido al danés Erling Juhl Nielsen⁴⁰⁹. Estos compuestos tienen por fórmula general



Pen COO representa penicilina de la que se ha quitado un átomo de hidrógeno al grupo carboxílico.

R representa un grupo alquileo con dos a ocho átomos de carbono, de cadena lineal o ramificada.

R₁ y R₂ son grupos alquilo que no tengan más de doce átomos de carbono cada uno, o grupos que -conjuntamente con el átomo de nitrógeno- forman un anillo heterocíclico.

R₃ representa un átomo de hidrógeno o un grupo de aminas.

El procedimiento consiste en mezclar una solución acuosa de una sal soluble del éster de penicilina con una solución acuosa de una sal soluble en agua del ácido p-amino-benceno-sulfónico o del ácido p-fenil-hidrazín-sulfónico, ambas partes disueltas en un disolvente orgánico en el cual la sal deseada sea poco soluble, provocando la reacción de los dos componentes de la mezcla, después de lo cual el precipitado que se ha formado se separa del disolvente⁴¹⁰.

Es ventajoso, a veces, combinar la preparación de la sal deseada con la producción de éster, particularmente cuando el éster o su sal soluble es difícil de aislar, o cuando tal éster es de peso molar relativamente alto o de una estructura compleja.

Los autores presentan los resultados de algunos ensayos biológicos realizados con sulfinatos obtenidos de acuerdo con este procedimiento y han comparado sus efectos con los de la sal de procaína de bencil-penicilina; los datos disponibles muestran las condiciones ventajosas logradas al aplicar los productos objeto de esta patente⁴¹¹. En la memoria descriptiva se especifica el *modus operandi* para la obtención de algunos de estos compuestos⁴¹².

Mediante otros ejemplos se muestra el procedimiento para producir sulfanilato del éster de n-propil-amino-etil de bencil-penicilina y sulfanilato del éster de penicilina

⁴⁰⁸ AHOEPM, patente 213.519; la memoria descriptiva consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola cara, fue firmada en Madrid, a 6 de febrero de 1954, por Knud Abildgaard-Elling. La empresa figura como domiciliada en 19, Bronshøjvej de Copenhagen (Dinamarca); la patente había sido, previamente, solicitada en Gran Bretaña, bajo el número 347/53, con fecha 6 de febrero de 1953. La patente española fue concedida el 17-III-1955 y publicada el 16-IV-1955.

⁴⁰⁹ De quien nos consta su domicilio: Værnersvej, 7. Chalottenlud (Dinamarca).

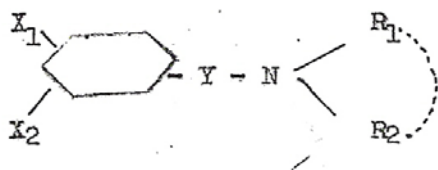
⁴¹⁰ Los autores indican que cuando el alquileo contiene entre dos y cuatro átomos de carbono en cadena lineal y el número total de átomos de carbono no excede de seis, se producen compuestos de mayor valor terapéutico. Los ésteres preferidos son los ésteres de bencil-penicilina (penicilina G), pero pueden emplearse los de cualquier otra, incluso las mezclas de varias penicilinas obtenidas por cultivos sumergidos.

⁴¹¹ El ensayo consistió en inyectar, en ratas de un peso medio de 200 g., 2.500 U.I. de los compuestos objeto de esta patente, suspendidos en 1 cm³ de agua; una hora después de la inyección los animales se sacrificaron y se determinó la concentración de penicilina en los pulmones y en sangre.

⁴¹² Comentamos este primer caso, a modo de ejemplo: se disuelven en 25 cm³ de agua, 2,2 g. del hidro-cloruro del éster dimetil-amino-etil de bencil-penicilina; a esta disolución se le añaden 5 cm³ de una solución 1 M del sulfonato p-amino-benceno. El sulfanilato del éster di-metil-amino-etil de la bencil-penicilina se precipita y se filtra; se obtienen 2,3 g., tiene un punto de fusión de 171°-172° C. Además de este sulfanilato es posible preparar, de manera análoga, los sulfanilatos de los ésteres de penicilina de N-metil-N-etil-amino-etanol, dietil-amino-etanol, dietil-amino-2,2-dimetil-propanol, 1-dietil-amino-4-metil-butanol, piperidino-etanol, piperidino-etanol, 4-metil-piperazino-etanol o morfolin-etanol, en función de sus diferentes puntos de fusión.

di-n-butil-amino-etil; sulfanilato del éster dietil-amino-etil de bencil-penicilina y los sulfanilatos del éster dioctil-amino-etil de bencil-penicilina, del éster metil-dodecil-amino-etil y del éster didodecil-amino-etil de bencil-penicilina; sulfanilato del éster 8-dietil-amino-octil de bencil-penicilina; fenil-hidrazín-p-sulfonato del éster beta-dietil-amino-etil de penicilina; fenil-hidrazín-p-sulfonato del éster de bencil-penicilina dimetil-amino-etil y fenil-hidrazín-sulfonato del éster morfolino-etil de bencil-penicilina.

El 19 de agosto de 1954, la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó, ante el registro español de patentes, una solicitud, por veinte años, para proteger un “Método para la producción de mono o di-ésteres de penicilina”⁴¹³. Los autores de este procedimiento mantienen que pueden conseguirse efectos acumulativos de antibiótico en tejidos pulmonares mediante la utilización de ésteres de penicilina con fenoles o tío-fenoles sustituidos básicamente; los cuales, además, proporcionan un gran porcentaje de la cantidad total de penicilina acumulada en los tejidos en forma de penicilina libre y presentan una toxicidad algo más baja que la de los ésteres conocidos. Estos ésteres son momo- o di-ésteres de fenoles o tío-fenoles, cuya fórmula general responde a:



X₁ representa -OH o -SH.

X₂ representa H, -OH o -SH.

R₁ y R₂ representan grupos alcoholos o partes de un grupo que, junto con el átomo de nitrógeno, forma un anillo heterocíclico.

Y representa un grupo alcoholeno o un grupo alcoholeno ligado a un átomo de carbono del núcleo de benceno a través de uno de los grupos siguientes: -O-, -S-, -NH-, -NR-, -RO-, -CO-, -COO-, CONU-, -COS-, CSO-, -NHCO-, -NRCO-, NHCS-, NRCS-, -CSNH ó -CSNR-, siendo R un grupo alcoholo o un grupo alcoholeno.

El método consiste en hacer reaccionar un compuesto de dicha fórmula con un anhídrido de penicilina en el que se disponga un ácido carboxílico; la fórmula general del anhídrido es: PenCO-O-Z [PenCO representa un ácido penicilínico del grupo carboxílico, del cual se ha extraído el grupo hidrófilo y Z alude a un grupo acilo, que incluye los grupos acilos del ácido penicilínico y los ésteres mono-alcohólicos del ácido carbónico].

Como la producción del anhídrido penicilínico es dificultosa y encierra grandes pérdidas, los autores prefieren emplear un anhídrido mixto de penicilina y un ácido mono-carboxílico aromático, tal como el ácido benzoico y, preferentemente, un anhídrido mixto de penicilina y un mono-éster de ácido carbónico. Estos anhídridos

⁴¹³ AHOEPM, patente 217.052; la memoria descriptiva consta de treinta hojas, escritas a máquina por una de sus caras; queda firmada en Madrid, a 19 de agosto de 1954. La empresa figura como establecida en Bronshøjvej 19, Copenhague (Dinamarca). Esta solicitud se corresponde a la presentada en Dinamarca con fecha 20 de agosto de 1953, bajo el número 2702/53. La patente española fue concedida el 19-VIII-1955 y publicada el 1-XII-1955.

mixtos se obtienen haciendo reaccionar una sal penicilínica con un éster de ácido cloro-carbónico en un disolvente inerte⁴¹⁴.

Se puede emplear cualquier sal penicilínica; no obstante, es preferible utilizar sales penicilínicas con aminas terciarias, tal como la sal de trietil-amina o la de N-etil-piperidina, o con metales alcalinos, tales como las sales sódica o potásica.

Al realizar el proceso de esterificación se pueden emplear una gran variedad de disolventes, excepto los compuestos orgánicos que contengan uno o varios grupos hidroxilo, pues dichos compuestos reaccionan con el derivado de penicilina que se usa en el proceso. Los disolventes utilizados pueden ser inmiscibles con el agua, tales como los hidrocarburos clorados, o bien miscibles en agua, como por ejemplo acetona, pudiendo contener el medio de reacción determinadas cantidades de agua.

Si la obtención del anhídrido de penicilina con un ácido carboxílico se realiza en el mismo medio que se emplea para la esterificación, que es lo preferible, entonces el empleo de un disolvente orgánico, al menos parcialmente soluble en agua, tiene la ventaja de que se puede añadir al medio, aumentando con ello la solubilidad de las sales de metal alcalino de la penicilina, cuando se ha usado dicha sal como material de partida. No obstante, existe el inconveniente de que el agua presente en el medio tiende a descomponer el anhídrido formado y, en consecuencia, disminuye el rendimiento total⁴¹⁵.

El procedimiento se ha de realizar a temperaturas comprendidas entre -20° C y 40° C; una temperatura conveniente es la de 0° C. Es preferible llevar a cabo la esterificación del derivado penicilínico inmediatamente después de la obtención de dicho derivado, sin aislarlo. La obtención de derivados penicilínicos, así como en determinados casos la esterificación, queda favorecida cuando se realiza en presencia de un catalizador básico⁴¹⁶.

Los ésteres pueden ser aislados como tales de la mezcla de reacción o bien en forma de sus sales ácidas⁴¹⁷. Los ésteres que se obtienen son, generalmente, aceites viscosos o polvos amorfos, si bien en algunos casos pueden ser cristalinos; las sales son cristalinas o amorfas. Si los ésteres se han de aislar, se puede lavar la mezcla de reacción con una solución acuosa de bicarbonato sódico y agua, secándola sobre MgSO₄; el disolvente puede ser evaporado al vacío, quedando el éster como residuo. Si lo que se desea es una sal, se añade una solución del ácido en cuestión a la mezcla lavada y secada; si con ello no se consigue la precipitación de la sal, esto se puede lograr agregando a continuación un disolvente apropiado.

El autor realizó pruebas biológicas con los compuestos obtenidos de acuerdo con este procedimiento, valorando los niveles de penicilina en sangre, pulmón, hígado, riñón

⁴¹⁴ Los ésteres de ácido cloro-carbónico tienen la fórmula general: Cl-CO-O-R, donde R es un grupo alcohilo. Estos ésteres se denominan, también, ésteres del ácido clorofórmico.

⁴¹⁵ Entre los hidrocarburos empleados como disolventes en el proceso que se estudia puede usarse benceno, aunque éste es menos apropiado que los compuestos orgánicos oxigenados. Los hidrocarburos alifáticos no son apropiados, pues los compuestos que reaccionan tienen muy poca solubilidad en tales hidrocarburos.

⁴¹⁶ Los autores citan, a modo de ejemplo, que si se emplea una sal metálica de penicilina, es preferible agregar una pequeña cantidad de una base orgánica, como podría ser la tri-etil-amina o piridina, a la mezcla de reacción; puede usarse 0,01% a 0,02% de piridina.

⁴¹⁷ Ejemplos de estos ácidos son los formados por el ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, cítrico, láctico, benceno-sulfónico, toluen-sulfónico y la penicilina.

y bazo de cobayas, una y dos horas después de una inyección subcutánea; se realizó una comparación entre los compuestos obtenidos de acuerdo con este procedimiento y las sales sódica y procaínica de penicilina. También se comparó el efecto retardado de uno de los compuestos obtenidos mediante este procedimiento, el citrato del éster de bencil-penicilina-4-(beta-dietil-amino-etil)-fenilo, con el hidro-yoduro del éster de bencil-penicilina-dietil-amino-etilo, de la sal sódica de bencil-penicilina y de la sal procaínica; todas estos compuestos fueron inyectados, por vía subcutánea, en cobayas, en dosis de 50.000 U.I. por animal, determinándose el nivel de penicilina en sangre y pulmones a distintos intervalos, después de la inyección. Los resultados obtenidos muestran la mayor acumulación del compuesto propuesto en el pulmón y un efecto más retardado que cualquier otro compuesto penicilínico. Mientras sea mayor la proporción entre penicilina libre y el éster penicilínico, tanto mayor es la actividad antibiótica.

En otro experimento los autores estudiaron la distribución entre penicilina libre y penicilina en forma de éster. Para ello se inyectaron a monos, por vía intramuscular, una dosis de 50.000 U.I./kg. de peso de citrato del éster de bencil-penicilina-4-(beta-dietil-amino-etil)-fenilo, hidro-yoduro del éster de bencil-penicilina-dietil-amino-etilo y la sal sódica de penicilina, determinándose los niveles de penicilina en sangre y en pulmón dos horas después de la inyección; también se estudió la distribución entre penicilina libre y el éster penicilínico.

Fue determinada, igualmente, la sensibilidad de cierto número de cepas bacterianas frente a la sal sódica de penicilina y al citrato del éster de bencil-penicilina-4-(beta-dietil-amino-etil)-fenilo, empleando series diluidas. La penicilina libre del citrato del éster de bencil-penicilina-4-(beta-dietil-amino-etil)-fenilo se libera lentamente, por lo que era de esperar que, al emplear esta técnica, el penicilinato sódico tuviera alrededor de doble actividad que este compuesto, y así se hizo patente en la mayoría de los experimentos; sin embargo, se comprobó que las cepas penicilino-resistentes, productoras de penicilinas, del *Micrococcus pyogenes* v. *aureus*, eran más sensibles al citrato del éster de bencil-penicilina-4-(beta-dietil-amino-etil)-fenilo que al penicilinato sódico.

Los autores proponen una veintena de ejemplos que ilustran métodos para la producción de los compuestos señalados en esta patente⁴¹⁸.

⁴¹⁸ Dejamos anotado el primero de ellos: una cantidad de 18,6 g. (1/20 moles) de la sal potásica de bencil-penicilina es suspendida en 100 cm³ de cloruro de metileno que contenía 4,8 cm³ de clorocarbonato etílico (1/20 moles). La mezcla se enfría con hielo y, a continuación, se le agregan 2 cm³ de una solución al 1% de piridina en cloruro de metileno. La nueva mezcla se agita y se deja reposar durante 30 minutos; después se agrega, de una vez, una solución de 9,65 g. de 4-(beta-dietil-amino-etil)-fenol en 40 cm³ de cloruro de metileno; se deja reposar durante otros 30 minutos, se extrae por filtración el cloruro potásico precipitado y se añade al filtrado una solución de 5,25 g. (1/40 moles) de ácido cítrico monohidratado en 100 cm³ de butanol. A continuación se evapora el cloruro de metileno en el vacío, inmediatamente después se agregan otros 5,25 g. de ácido cítrico mono-hidrato en 100 cm³ de butanol, con lo cual precipitan 28-29 g. de citrato del éster de bencil-penicilina-4-(beta-dietil-amino-etil)-fenol, que tiene una pureza de 95%-100%, un punto de fusión de 80° C, (alfa) 20/D = + 136° (C = 2,5% en agua). Es posible, en este ejemplo, sustituir el cloro-carbonato etílico por la cantidad equivalente de otros cloruros ácidos, obteniéndose altos rendimientos de citrato del éster bencil-penicilina-4-(beta-dietil-amino-etil)-fenol; estos cloruros ácidos a los que se ha hecho referencia son los siguientes: cloro-carbonato metílico, cloro-carbonato n-propílico, cloro-carbonato n-butílico, cloro-carbonato iso-butílico, cloro-carbonato n-hexílico, cloruro trimetil-lacetílico, cloruro difenil-acetílico, cloruro de ácido alfa-etil-hexanoico y cloruro benzoílico.

El 11 de septiembre de 1954, un par de laboratorios ibéricos: los *Laboratorios Atral L^{tda}* de Lisboa y los *Laboratorios del Dr. Esteve S.A.* de Barcelona, hacen llegar al registro de patentes un expediente común para proteger una invención relacionada con un “Procedimiento para preparar derivados del ácido penicilínico, con actividad terapéutica”⁴¹⁹.

Los autores parten del progreso que ha supuesto la obtención de penicilinas con bases orgánicas, capaces de formar compuestos poco solubles, que tienen acción prolongada. Dentro de estas sales sobresalen las etilén-diaminas disustituidas simétricas y, en particular, la N,N'-dibencil-etil-diamina; con esta última sustancia, el ácido penicilínico forma un compuesto de muy poca solubilidad, dotado de actividad terapéutica (la que corresponde por su riqueza en ácido penicilínico) y que posee la ventaja de ser muy estable a las temperaturas habituales de España.

Pero la insolubilidad, tanto la de N,N'-dibencil-etileno-diamina como la del dipenicilinato de N,N'-dibencil-etileno-diamina en agua, dificulta grandemente la obtención del producto cristalino; dificultad que se acentúa por la insolubilidad de esta última sustancia en la mayor parte de los disolventes orgánicos. Si para preparar dichas sales se emplea el método general de obtención, la reacción de doble descomposición en soluciones acuosas, se obtienen masas cristalinas de tal naturaleza física que dificulta su utilización en suspensiones inyectables.

Según los autores de esta memoria, esta dificultad puede vencerse mediante un método de extracción del ácido penicilínico de su solución en acetato de amilo, que consiste en emplear una solución de la sal de N,N'-dibencil-etileno-diamina de un ácido carboxílico débil en un disolvente no miscible con el acetato de amilo, que permita utilizarlo para la obtención en forma cristalina de la correspondiente sal de penicilina. El único líquido capaz de disolver apreciablemente el penicilinato de N,N'-dibencil-etileno-diamina, sin ser miscible con el acetato de amilo es, probablemente, la formamida. Es preferible utilizar un volumen de formamida insuficiente para disolver toda la dipenicilina formada, pues así las pérdidas son más pequeñas y se evita la disolución en la formamida de un exceso de acetato de amilo, que complicaría posteriormente el proceso de cristalización.

Utilizando una cantidad insuficiente de formamida puede obtenerse el producto adecuadamente, en especial si se insemna la solución con cristales del derivado penicilínico para formar núcleos de cristalización. Hasta un 50% de la sal formada se encuentra en forma cristalina cuando se realiza la extracción, manteniéndose los cristales en suspensión en el acetato de amilo. La fase formamídica se calienta luego a 45°-55° C, se le adiciona agua a la misma temperatura y se deja cristalizar por enfriamiento, en presencia de núcleos de cristalización con cristales obtenidos en la operación anterior⁴²⁰.

⁴¹⁹ AHPM, patente 217.456; la memoria descriptiva consta de seis hojas foliadas, escritas por una sola cara, firmadas, en Barcelona, el 11 de septiembre de 1954. La sociedad portuguesa figura como residente en Lisboa, avenida Gomes Pereira 76-78 y la española en Barcelona, avenida de la Virgen de Montserrat 209. La patente española, de invención, fue concedida el 9-X-1954 y publicada el 16-XI-1954.

⁴²⁰ Los autores presentan un ejemplo ilustrativo: en un frasco o balón de 500 cm³ se colocó una solución de 13 g. de ácido penicilínico G en 150 cm³ de acetato de amilo y se adicionó una solución de 7,1 g. de diacetato de N,N'-dibencil-etileno-diamina en 150 cm³ de formamida; se mezclan las dos soluciones haciendo girar el frasco y agitándolo mecánicamente, por un tiempo mínimo de una hora. Se procede luego a la siembra de cristales de dipenicilinato de N,N'-dibencil-etileno-diamina y el frasco se introduce en un frigorífico; después de 24 horas, el contenido del frasco se transfiere a un embudo de

El 26 de noviembre de 1954 la norteamericana *American Home Products Corporation* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, una invención relativa a “Un procedimiento de separar penicilina”⁴²¹ desarrollado por Joseph Lester Szabo y William F. Bruce, investigadores habitualmente relacionados con la empresa *Wyeth Inc.*⁴²².

Estos compuestos son sales de penicilina con ciertas alcoholen-diaminas sustituidas, que tienen por fórmulas generales: $R-NH_2-Y-NH_2$, $R-NH-Y-NH-R_1$, $R-R_1-N-Y-NH_2$, donde R y R₁ pueden representar radicales alifáticos, aromáticos alicíclicos o heterocíclicos, con y sin sustituyentes e Y representa un radical alcoholeno con dos a doce átomos de carbono. Tales diaminas son útiles para separar penicilina desde soluciones acuosas formando sales con ella, ya que las sales resultantes son terapéuticamente activas y prácticamente insolubles -o escasamente solubles- en un medio acuoso⁴²³.

Desde el punto de vista terapéutico, una de las sales de penicilina virtualmente insolubles en medio acuoso más útil es la sal de penicilina con N,N'-dibencil-etilén-diamina, más particularmente la sal de di-penicilina de esta amina. La parte amínica de esta sal de dipenicilina está representada por la fórmula: $C_6H_5-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-C_6H_5$. En la memoria se presenta una descripción de la preparación de esta sal, que puede considerarse como ilustrativa de la preparación de cualquiera de las otras sales de penicilina.

El procedimiento habitual de recuperación de penicilina empleado en los comienzos de la década de 1950 requiere dos extracciones separadas de ácido

decanación para separar las fases líquidas. La fase que contiene el acetato de amilo junto con los cristales en suspensión, se filtra y el sólido retenido en el filtro se lava con acetona y se deseca al vacío sobre cloruro cálcico anhidro. Se obtuvieron unos 6,7 g. de cristales con una humedad de 8,1%. La fase formamídica se calienta a 45°-55° C, preferentemente a 50° C; se diluye dos veces su volumen con agua, a la misma temperatura, en presencia de cristales de dipenicilinato de N,N'-dibencil-etileno-diamina; la suspensión se deja enfriar, una vez fría se lleva al frigorífico donde se mantiene 12 horas. Se separan los cristales, se lavan con agua y con acetona y se desecan en el vacío sobre cloruro cálcico anhidro; se obtienen 7,0 g. de dipenicilinato de N,N'-dibencil-etileno-diamina.

⁴²¹ AHOEPM, patente 218.678; la memoria descriptiva consta de diecinueve hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 26 de noviembre de 1954. La empresa figura establecida en 22 East 40th Street, Nueva York (EE. UU.). La patente española fue concedida el 14-III-1955 y hecha pública el 16-IV-1955.

⁴²² Los autores señalan que estas sales de penicilina, virtualmente insolubles y terapéuticamente utilizables, son las descritas en la patente norteamericana de Joseph L. Szabo y William F. Bruce, registro 2.627.491, expedida el 3 de febrero de 1953. Pudiera sorprender que se señale tal patente como referencia; Marshall SITTIG (*Pharmaceutical manufacturing encyclopedia. Second edition.* 2: 1175. Westwood [New Jersey]: Noyes Publications, 1988), quien adjudica la patente a Joseph Lester Szabo y William F. Bruce, la atribuye a la empresa *Wyeth, Inc.*; la misma atribución señala la *United States Patent Office* [<http://www.freepatentsonline.com/2627491.pdf>]. No cabe confusión, *Wyeth Inc.* fue una empresa farmacéutica propiedad del holding *American Home Products Corporation* (AHP), con anterioridad a su adquisición por *Pfizer*, acaecida en octubre de 2009.

⁴²³ Entre las sales específicas esencialmente insolubles en medio acuoso, a cuya separación desde soluciones de penicilina o de ácido penicilínico se refiere este procedimiento, los autores incluyen N,N'-dibenzhidril-etilén-diamina, N,N'-di(alfa-metil-bencil)-etilén-diamina, N,N'-dibeta-fenil-etilén-diamina y las sales de penicilina con diaminas sustituidas que contienen sustituyentes anulares, tales como N,N'-dihidroxi-bencil-etilén-diamina, N,N'-dihalogeno-bencil-etilén-diamina, N,N'-di-alcoxi inferior-bencil-etilén-dimina.

penicilínico libre y, en la segunda operación de extracción, aquella en la cual el ácido penicilínico es separado de la solución tampón acuosa por medio de un disolvente orgánico, la pérdida de penicilina por descomposición es considerable; incluso aunque se reduzca el tiempo de contacto durante el cual están reunidos el disolvente de extracción orgánico y la disolución tampón acuosa; estas pérdidas de potencia penicilínica constituyen un serio inconveniente en los procedimientos de separación usuales.

La primera operación del procedimiento implica la conversión de la penicilina presente como ácido penicilínico a la forma de una sal de penicilina que sea muy soluble en agua, permitiendo así la separación cuantitativa de la actividad penicilínica cuando la solución, en disolvente orgánico, se extrae con un líquido acuoso. La separación de las impurezas desde la sal de penicilina, aún cuando es importante, no es del máximo interés durante esta fase y la sal de penicilina se puede acondicionar, para continuar el proceso industrial que se pretende, por medio de una amina orgánica⁴²⁴.

Esta amina puede ser añadida, en forma de una solución acuosa, a la solución de ácido penicilínico en un disolvente orgánico, no polar, inmisible en agua⁴²⁵; también puede ser adicionada como solución de la misma en el disolvente orgánico y el agua necesaria para extraer la penicilina, en la forma de su sal amínica acuosoluble, puede adicionarse por separado. Ambas operaciones se realizan en un equipo de extracción centrífuga comercialmente disponible, en contracorriente; cuando el extracto acuoso rico en la sal amínica de la penicilina abandona el equipo de extracción, se divide en dos corrientes: una vuelve como material de devolución a la fase de extracción y la otra se dirige hacia un depósito para su ulterior reacción.

El empleo de una amina que es soluble en el disolvente orgánico y que forma, con el ácido penicilínico, una sal que tiene una relación de distribución disolvente/agua tal que pueda extraerse fácilmente, tiene ventajas bien definidas: es posible suministrar la amina en forma de una solución en el disolvente orgánico en el cual es disuelto el ácido penicilínico, siendo el agua necesaria para extraer la sal amínica de penicilina suministrada por separado al aparato de extracción, esto permite restringir la cantidad de agua suministrada, de modo que puede asegurarse con más facilidad una solución acuosa de la sal amínica de penicilina con mayor concentración en penicilina; también es posible controlar la relación de agua a solución con mucha mayor facilidad y con más eficacia que con los procedimientos que en este momento se disponen, dado que el agua es introducida en la operación de separación final, y es agua ordinaria y no solución alcalina, tal como era habitual en los procedimientos en los que se utilizan soluciones tampón alcalinas, como son las soluciones de fosfatos de sodio, pues no hay contacto de la penicilina con un líquido acuoso de pH elevado, que originaría la destrucción de una gran cantidad de la actividad penicilínica.

⁴²⁴ La amina orgánica empleada debe ser soluble en disolvente orgánico y cuya sal de penicilina sea muy soluble en agua; entre las aminas que responden a estos requisitos se pueden citar las alcohol-aminas solubles en disolventes orgánicos en las cuales el sustituyente que está unido al nitrógeno no posee más de cuatro átomos de carbono; se ha comprobado que son adecuadas la mono-etanol-amina, mono-isopropil-amina, mono-butil-amina, dietanol-amina, diisopropil-amina, dietil-etanol-amina, trietil-amina, amino-etil-etanol-amina y amina cíclica morfolina.

⁴²⁵ Tal como el acetato de amilo, una mezcla de acetatos con alcoholes amílicos, acetato isopropílico, acetato de n-butilo, cloroformo, éter etílico, metil-isobutil-cetona u otro disolvente orgánico que pueda emplearse para extraer penicilina en forma de ácido penicilínico desde una solución diluida del mismo.

La sal amínica acuosoluble de penicilina que así se ha obtenido se convierte posteriormente en una sal de penicilina más insoluble, preferiblemente en una de las sales amínicas de penicilina formada por reacción de una amina del tipo descrito con la sal insoluble de penicilina. La sal amínica insoluble de penicilina precipita con rendimientos prácticamente cuantitativos y, en medida muy considerable, la penicilina está libre de las impurezas con las cuales estaba mezclada en el caldo de fermentación.

La reacción entre la solución acuosa de la sal amínica acuosoluble de penicilina y una alcoholén-diamina sustituida del tipo antes comentado, puede realizarse en un equipo de depósito simple, meramente reuniendo los dos reactivos en un medio acuoso; el medio acuoso puede ser un disolvente orgánico para la amina, que contenga agua; el disolvente preferido es acetona o formida, pero es posible emplear otros disolventes orgánicos que se encuentren en el comercio. La sal activa de penicilina se recupera prácticamente libre de impurezas con las cuales la penicilina suele estar asociada en el caldo de cultivo. Por la purificación del producto no hay reducción del rendimiento y no se experimentan pérdidas apreciables como resultado de destrucción o inactivación del material penicilínico⁴²⁶.

⁴²⁶ Los autores, para completar su exposición teórica, proporcionan un ejemplo de recuperación de penicilina realizado de acuerdo con su método mejorado: un volumen de 5.000 l. de un caldo de fermentación de penicilina, con una potencia de 5.000 U.O./ml., se somete a un proceso de extracción, en un extractor centrífugo del tipo 'Podbielniak' que contenía 1.000 l. de 'pentacetato' a un pH 2; este disolvente consiste en una mezcla de acetatos de amilo, que pueden o no contener cantidades adicionales de alcoholes amílicos mixtos. La extracción se llevó a cabo de acuerdo con operaciones usuales de recuperación de penicilina; el extracto de acetato de amilo, rico en ácido penicilínico, se introdujo en un segundo extractor centrífugo del mismo tipo que el anterior. Una solución al 5% de trimetil-amina en 'pentacetato' se añadió a la solución de ácido penicilínico en un disolvente orgánico, por medio de un fluxómetro y se alimentó con agua en contracorriente a través del extractor centrífugo en una relación de una parte de agua por dieciocho partes de la solución de penicilina en acetato de amilo. El pH del efluente acuoso se mantuvo a pH 7,2 por ajuste de la proporción del paso de trimetil-amina al extractor y se devolvió al ciclo una cantidad suficiente del extracto acuoso de ácido penicilínico en acetato de amilo para constituir del 25% al 30% de la alimentación. Una vez que se hizo reaccionar la solución de ácido penicilínico en acetato de amilo con trimetil-amina en el extractor centrífugo, alimentándola con agua en contracorriente en la relación anteriormente dicha, se obtuvieron 65 l. de una solución acuosa de la sal trietil-amínica de penicilina, con una potencia de 34.000 U.O./cm³, determinada por ensayo yodométrico.

Una solución de diacetato de dibencil-etilén-diamina, de concentración 1,25 N, se pesó en cantidad suficiente para dar la cantidad teórica de la amina necesaria para reaccionar con la penicilina para formar dibencil-etilén-diamina-dipenicilina, más un exceso adicional de *ca.* 10%. Cuando se prepara la sal de dibencil-etilén-diamina, conviene emplear 1,48 l. de la solución 1,25 N de diacetato de dibencil-etilén-diamina por billón de unidades de potencia. El extracto rico en la sal de trietil-amina de penicilina se trató con carbón activo, utilizando de 2-5 g. de carbón decolorante por litro de extracto. A continuación se filtró, a través de un filtro para bacterias, una cantidad de acetona aproximadamente igual a dos tercios del volumen de solución, y la mezcla se calentó a 30° C, agitando al mismo tiempo; alternativamente, pudo añadirse formamida en lugar de acetona. La solución de diacetato de dibencil-etilén-diamina, de concentración 1,25 N antes pesada, se añadió entonces y la sal cristalina de dibencil-etilén-diamina de penicilina se formó en la mezcla de reacción; el pH de la mezcla resultante se ajustó a 6,5 por la adición de una pequeña cantidad de ácido acético glacial; alternativamente, el ácido acético pudo añadirse a la solución de diacetato de dibencil-etilén-diamina antes que esta última se adicionase a la solución de penicilina. Los cristales formados se enfriaron a 10° C; esta papilla fría se filtró a través de un filtro de succión. La torta del filtro se lavó varias veces, primero con acetona acuosa de concentración al 50% y luego con acetona pura. El producto se secó luego a presión menor que la atmosférica y fue calentando a una temperatura de 50°-60° C.

Análogamente, al hacer reaccionar la amina que forma la sal prácticamente insoluble de penicilina como resultado de la primera etapa, en lugar de dibencil-etilén-diamina (o un sal de la misma), se podría usar cualquiera de las aminas tal como se ha expuesto en lo que antecede; así se obtienen resultados muy buenos con aminas tales como N,N'-dibenzhidril-etilén-diamina, N,N'-dibeta-fenil-etilén-diamina, N,N'-dihidroxibencil-etilén-diamina, N,N'-dihalobencil-etilén-diamina y N,N'-dibencil-

El 8 de junio de 1955, un empresario argentino, Sebastián Bagó Basagañas⁴²⁷, presentó a registro un expediente para proteger, por veinte años, “Un procedimiento para preparar dipenicilinos de N,N’-bis-(naftil-metil)-etilén-diaminas”⁴²⁸, unas sales muy estables y escasamente solubles en agua, por lo que tienen una acción terapéutica prolongada cuando se aplican por vía inyectable; como experimentan poca destrucción en el sistema digestivo, también es posible aplicarlas por vía oral. Al ser muy poco solubles en agua, su preparación es de utilidad para la extracción y purificación industrial de la penicilina.

Las alquilén-diaminas usadas en estas preparaciones, bien como bases bien como sales, no figuran registradas en los índices bibliográficos anteriores a la década de 1955. El inventor propone que, cuando estas sales de penicilina se usen con fines terapéuticos, se emplee un agente dispersante y complejante, como la polivinil-pirrolidona, pues favorece el efecto terapéutico de las formas inyectables.

Si el inyectable preparado dispersando estas sales de penicilina es un vehículo acuoso con un 15% de polivinil-pirrolidona y se aplica intramuscularmente en dosis de 50.000 U.I./kg. de peso del paciente, en una inyección única, se consiguen penicilemias [sic] útiles durante periodos de doce a quince días, efecto que no es posible lograr cuando estas sales insolubles de penicilina se suspenden en agua sola⁴²⁹.

etilén-diamina, en las cuales los anillos aromáticos están sustituidos por uno o más grupos alcoxi, siendo el radical alcohilo de pocos átomos de carbono. Otros ejemplos de aminas adecuadas son N,N’-difurfuril-etilén-diamina, N,N-bis-(3,5,5-trimetil-hexil)-etilén-diamina y N,N-di(alfa-metil-bencil)-etilén-diamina. Aún cuando en el ejemplo citado se utiliza el diacetato de N,N’-dibencil-etilén-diamina como sal reactiva, se pueden usar otras sales de diaminas para la reacción de la sal aminica de penicilina.

⁴²⁷ Francesc Roca lo vincula a los *Laboratorios Cusi*, antes de que emprendiera su aventura argentina: “Al 1934, Sebastià Bagó i Basagañas, un home dels Laboratoris Cusi, començà a dibuixar, a Buenos Aires, la trajectòria del que seria, en el futur, una important empresa multinacional: Laboratoris Bagó”. (Francesc ROCA. “Notícies de la Història de Catalunya. 1880-1945: La Revolució industrial Transatlàntica (3)”. *20 Minutos. Barcelona* [13-II-2006]: 6. Barcelona, 2006). El ‘emporio Bagó’ se instauró en Cataluña en los comienzos de la década de 1960; desde septiembre de 1963, las patentes se presentan bajo la propiedad de *Laboratorios Bagó*, domiciliados en la Ciudad Condal, en el número 174 de la Vía Augusta (AHOEPM, patente 291.580).

⁴²⁸ AHOEPM, patente 222.304; la memoria descriptiva consta de ‘156 líneas’, firmadas en Madrid, a 8 de junio de 1955. La empresa fija su domicilio social en Buenos Aires (Argentina), en el número 1.468 de la Rivera Indarte; no obstante, su propietario, Sebastián Bagó, hace constar su nacionalidad española. La patente española le fue concedida el 18-X-1955 y publicada el 1-XII-1955.

⁴²⁹ El autor plantea un par de casos prácticos; el primero de ellos queda destinado a la preparación del penicilinato de N,N’-bis-(naftil-metil)-etilén-diamina, para el que requiere dos técnicas.

Técnica a, en éter: 460 mg. (0,001 moles) de diacetato de N,N’-bis-(1-naftil-metil)-etilén-diamina se suspenden en solución acuosa de hidróxido de sodio y se extraen con éter; la extracción etérea se lava con agua, se seca con sulfato de sodio anhidro y se filtra; se agrega la solución etérea de ácido penicilínico procedente de una solución acuosa de 1,12 g. (0,003 moles) de penicilina potásica acidificada con 2,5 ml. de ácido clorhídrico 1 N, inmediatamente precipita la sal de penicilina en forma de polvo cristalino, tan fino que prácticamente no puede separarse por filtración ni aún después de haber sometido la solución a 24 horas de frigorífico.

Técnica b, fase acuosa: 460 mg. (0,001 moles) de diacetato de N,N’-bis-(1-naftil-metil)-etilén-diamina se disuelven, en caliente, en 15 ml. de alcohol metílico y 15 ml. de acetona; la mezcla se enfría, se agregan 15 ml. de agua y se hiela; a continuación se agregan 823 mg. (0,0022 moles) de penicilina potásica disuelta en 5 ml. de agua; se forma un precipitado blanco cristalino, se deja dos horas en el frigorífico, se filtra, se lava varias veces con agua y se deseca al vacío sobre silicagel; se obtienen 940 mg. (rendimiento del 94%) del dipenicilinato de N,N’-bis-(1-naftil-metil)-etilén-diamina como polvo fino cristalino blanco; se seca a 100° C al vacío; a 110° C los cristales se ablandan, fundiendo entre 143°-144°

En definitiva, se plantea un procedimiento par preparar dipenicilinos de N,N'-bis-(naftil-metil)-etilén-diaminas, el cual se caracteriza por producir una solución de una N,N'-bis-(naftil-metil)-etilén-diamina en un medio orgánico, reunirla en una solución de penicilina y separar el dipenicilinato de N,N'-bis-(naftil-metil)-etilén-diamina después de un tiempo.

El 7 de enero de 1956 es la empresa española *Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas* S.A. quien presenta ante el registro de patentes "Un procedimiento para preparar derivados del ácido penicilínico", con objeto de proteger su invención durante veinte años⁴³⁰. Se trata de un sistema práctico para la preparación de sales del ácido penicilínico con bases etilén-diaminas disustituidas del tipo: $R-NH-CH_2-CH_2-NN-R_1$ donde R y R_1 pueden ser grupos arílicos, alquílicos, simétricos o diferentes entre si.

Estas sales se pueden preparar de una forma muy elemental, por medio de una reacción de doble descomposición de las sales de ambos compuestos en solución acuosa; pero siendo el producto de la reacción insoluble, sería difícil lograrlo en un estado de división perfecta, mientras que interesa, a efectos terapéuticos, obtener una sal microcristalina apta para ser inyectada en forma de suspensión con vehículo líquido.

A tal efecto, se prepara dicha sal haciendo reaccionar el ácido penicilínico en solución cetónica con una solución acuosa de di-acetato de la etilén-diamina disustituida, agitando y enfriando, como se describe en el siguiente ejemplo: se prepara una solución de 270 g. de ácido penicílico en 300 cm³ de acetona; aparte se prepara una solución de 145 g. de di-acetato de N,N'-dibencil-etilén-diamina en 750 cm³ de agua destilada; se filtran ambas soluciones. La solución cetónica se somete a una agitación enérgica y se añade, gota a gota, la solución acuosa; la masa líquida se deja durante 24 horas en una cámara frigorífica o en un baño de salmuera, a -5° C, siempre con agitación. Se filtra, se lava con acetona y agua, luego se seca en vacío; el producto que se obtiene, dipenicilato de N,N'-dibencil-etilén-diamina, es un polvo blanco microcristalino que posee una actividad antibiótica de 1.200 U.I./mg.

El 8 de octubre de 1956 es una empresa noruega, *A/S Apothekernes Laboratorium for special-preparater* quien presenta, ante el registro de patentes

C, el nitrógeno calculado para $C_{24}H_{24}N_2-(C_{16}H_{18}N_2S)_2$ es de 8,33%, el nitrógeno hallado es 8,27%. La sal de penicilina obtenida es insoluble en agua; la solubilidad determinada en agua, a 25° C, puede estimarse entre 0,002% a 0,003%; la valoración biológica arroja una actividad calculada de 1.180 U.I./mgr y la actividad hallada es de 1.100 U.I./mg.; la solución necesaria para la valoración se efectuó triturando 20 mg. de penicilinato V con gotas de 'Tween 20', 0,5 ml. de alcohol metílico y agregando agua lentamente mientras se agita; el volumen se complementa al litro, se procedió en la misma forma con el testigo de penicilina potásica para igualar las condiciones experimentales.

De manera similar, los autores plantean la preparación del dipenicilato de N,N'-bis-(2-naftil-metil)-etilén-diamina.

⁴³⁰ AHOEPM, patente 225.960; la memoria descriptiva consta de tres hojas foliadas y escritas a máquina, por una sola cara, fechadas en Madrid, a 7 de enero de 1956. La empresa figura como domiciliada en Barcelona, avenida San Antonio María Claret, 173. La patente fue concedida el 18-IV-1956 y publicada el 1-VI-1956.

español, un “Procedimiento para la preparación de sales de penicilina de dibencil-etileno-diamina”, con objeto de lograr su protección durante veinte años⁴³¹.

Los procesos descritos para preparar tales sales amínicas de penicilina hacen reaccionar una sal de amina con una sal de penicilina en solución acuosa, o la amina libre con la penicilina libre en disolventes orgánicos. Los autores han comprobado, de manera experimental, que no es posible precipitar la dibencil-penicilín-dibencil-etileno-diamina de una solución de una monosal de la base y las sales de penicilina comúnmente usadas; pero si se emplean otras sales amínicas o la sal amónica de penicilina sí es posible precipitar la dibencil-penicilín-dibencil-etileno-diamina de una solución de una monosal de amina y también la dibencil-penicilín-dibencil-etileno-diamina de una solución de la base libre.

La dibencil-penicilín-dibencil-etileno-diamina se emplea en suspensiones acuosas, difíciles de preparar de un modo satisfactorio mediante preparaciones concentradas ya que los cristales absorben gases del aire en su superficie y se forma una masa cremosa, no apta para el uso terapéutico. Para obtener una suspensión fluida se pueden añadir agentes tensoactivos, los cuales separan los gases de los cristales; experimentos con sustancias tensoactivas han demostrado que no son capaces de producir suspensiones fluidas si los cristales no tienen un determinado tamaño mínimo: estos cristales no deben ser mayores de 100 micras, debido a que la sedimentación en la preparación se produce demasiado deprisa y los cristales mayores pueden obstruir fácilmente las cánulas al aplicar una preparación. La formamida es el único disolvente útil para obtener un tipo cristalino satisfactorio, pero se necesitan grandes cantidades de formamida, por ejemplo 20 veces más de formamida que penicilina potásica, y como el precio de la formamida en el mercado es elevado, su uso en grandes cantidades implica un incremento en el precio de la preparación.

Según el método objeto de esta patente, se pueden obtener resultados satisfactorios empleando alcohol etílico corriente como disolvente, consiguiendo con ello un ahorro económico sustancial. Es posible usar soluciones de la base más concentradas (hasta de 50%), mientras que la sal correspondiente, que es más soluble, por ejemplo el di-acetato, da como máximo una solución de *ca.* 15%. Otra ventaja que tiene ese proceso es que la penicilina se puede emplear en forma de bencil-penicilín-procaína, la cual se obtiene como materia prima para la preparación de penicilina; la dibencil-etilén-diamina puede emplearse también para el aislamiento de la penicilina, pero se obtiene una dibencil-penicilín-dibencil-etilén-diamina impura, la cual tiene que refinarse por cristalización, proceso que es económicamente costoso a causa de la difícil solubilidad de los compuestos⁴³².

Al reaccionar un producto de bencil-penicilín-procaína con dibencil-etileno-diamina se obtiene una dibencil-penicilín-dibencil-etileno-diamina cuya pureza es adecuada. La base de procaína, obtenida de los cristales, se puede emplear directamente para aislar

⁴³¹ AHOEPM, patente 231.221; la memoria descriptiva consta de diez páginas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 8 de octubre de 1956. La entidad solicitante se encuentra establecida en Harbitz Allé 3, Skøyen, Oslo (Noruega). La patente española fue concedida el 10-I-1957 y publicada el 16-III-1957.

⁴³² A modo de ejemplo, en la memoria se cita el caso de la solubilidad de dibencil-penicilín-dibencil-etileno-diamina, que es solamente del 0,43% en acetona a 49° C y del 5,3% en alcohol etílico a 61° C. La solubilidad de la formamida es de 16% a 60° C, pero la formamida es un producto muy caro, que produce además una pérdida del orden del 20% al 30%. En otros disolventes, el compuesto es prácticamente insoluble.

bencil-penicilín-procaína como reactivo inicial; usando este procedimiento se logra un ahorro sustancial. Es posible obtener unas ventajas análogas haciendo reaccionar el ácido libre de una penicilina con una sal de la amina; en este caso, el ácido de penicilina libre se puede disolver en un disolvente orgánico que sea miscible con agua y añadir una solución acuosa de una sal de amina.

El proceso indicado se puede también utilizar para la preparación de otras sales de dibencil-etilén-diamina de penicilina, por ejemplo difenoxi-metil-penicilín-dibencil-etilén-diamina; como disolvente se pueden emplear aquellos que resulten más baratos, como por ejemplo: metanol, etanol o alcoholes terciarios o mezclas de los mismos y agua. También se pueden usar disolventes no miscibles en agua, como el acetato de butilo. La reacción puede tener lugar en un medio complementemente anhidro.

Según los autores de esta memoria, es éste el primer procedimiento en que se describe la preparación de sales de penicilina por reacción de ácido libre o de base libre con una sal. Es sorprendente el hecho de que, aunque las sales de penicilina son sensibles a la acción de los ácidos y de las bases, que tales reacciones puedan ser realizadas con un rendimiento favorable, y que existan buenas posibilidades para regular y variar el tamaño de los cristales, sin necesidad de volver a cristalizar la sales de penicilina⁴³³.

En definitiva, los autores exponen un procedimiento para la preparación de penicilina de dibencil-etilén-diamina que consiste en hacer reaccionar una sal amónica o una sal amónica de penicilina con la base libre de dibencil-etilén-diamina o hacer reaccionar una sal de dibencil-etilén-diamina con el ácido libre de una penicilina.

El 9 de octubre de 1956, Sebastián Bagó Basagañas, un español residente en Argentina, presenta, ante el registro de patentes, un expediente para proteger “Un procedimiento de preparación de dipenicilinato de dibencil-etilendiamina”⁴³⁴. El autor reconoce que ya se ha descrito un método para la obtención del mismo producto (*cf.* AHOPN, patente 222.304), pero el resultado ha sido una precipitación tan finamente pulverizada que dificulta enormemente las filtraciones y, además, el producto filtrado retiene mucho agua y su secado, a las temperaturas que conviene hacerlo, demora varios días incluso trabajando en el vacío⁴³⁵.

El método objeto de esta patente, según su autor, posee ventajas sobre el procedimiento conocido, como la de obtener el penicilinato en tal forma que su filtración resulte rápida y su secado se pueda efectuar en pocas horas. Otra ventaja que

⁴³³ Los autores completan la memoria con ocho ejemplos, bastante similares entre si; comentamos el primero de ellos: en 5 cm³ de alcohol etílico se disuelven 1,1 g. de dibencil-etilén-diamina; al mismo tiempo se obtiene otra solución formada por 30 cm³ de alcohol etílico caliente y 4,7 g. de bencil-penicilín-procaína. Se mezclan ambas soluciones y se añaden 30 cm³ de agua; la mezcla se deja enfriar, se filtra y el precipitado se lava con otra mezcla de alcohol etílico y agua. El rendimiento obtenido es *ca.* 85%.

⁴³⁴ AHOEPM, patente 231.233; la memoria descriptiva consta de ‘96 líneas’; queda firmada, en Madrid, a 9 de octubre de 1956. El solicitante fija su residencia en el número 1.468 de la Rivera Indarte, en Buenos Aires (Argentina), pero señala su nacionalidad española. La patente, de invención, fue concedida el 10-I-1957 y publicada el 16-III-1957.

⁴³⁵ El autor se refiere al método descrito por Joseph Lester Szabo; quizás el mismo que fuera registrado, en España, por la empresa norteamericana *American Home Products Corporation*, con fecha de 26-XI-1954 (AHOEPM, patente 218.678) (*vide supra*).

aporta es la de que, en caso de tratar penicilinas impuras, se logra un penicilinato claro, ya que las impurezas quedan disueltas en el solvente hidroalcohólico empleado. Es también otra ventaja de este procedimiento la obtención de un penicilinato que, una vez micronizado, es menos adherente a las superficies y fraccionable por equipos mecánicos.

El fundamento de este procedimiento consiste en que, si la sal de penicilina se produce en un medio hidroalcohólico, se forman cristales relativamente grandes, en forma de placas, y que dicho solvente es capaz de mantener en solución las impurezas de la materia prima de la penicilina. El procedimiento puede describirse, en líneas generales, de la siguiente forma: se prepara una solución alcohólica de una sal de dibencil-etilén-diamina en alcohol de alta concentración; esta solución se diluye, después de que se ha producido la primera cristalización, con un volumen de agua más o menos igual a la mitad del volumen total; a continuación se deja en reposo unas dos horas; se filtra el precipitado y se lava con alcohol de mediana graduación⁴³⁶.

El 17 de mayo de 1957 la empresa británica *Imperial Chemical Industries Limited* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento de obtención de nuevas sales de penicilina”⁴³⁷, concretamente las sales de amino-guanidina, que tienen utilidad terapéutica.

Estas sales tienen como fórmula general $A-NH-C=[NH]-NH-NH_2$, en la cual A representa un radical arílico, que puede tener sustituyentes, el grupo amino también puede estar sustituido por grupos alquilo, por grupos alquilideno, por grupos cicoalquilideno, por grupos aralquilideno o por grupos bencilideno.

El procedimiento para la preparación de las mencionadas sales de penicilina comprende la interacción de amino-guanidinas con una penicilina o una sal de ésta. Se hace reaccionar la base libre de la amino-guanidina con el ácido libre de la penicilina en un medio líquido inerte, por ejemplo un líquido orgánico tal como cloroformo o acetato de butilo. Como variante, se puede hacer reaccionar una sal de penicilina soluble en agua, por ejemplo una sal de metal alcalino, con una sal soluble en agua de la amino-guanidina, por ejemplo el cloruro o ioduro, en un medio acuoso. También es posible hacer reaccionar una sal de penicilina con una sal de amino-guanidina en un disolvente orgánico inerte en el que las dos sales sean solubles.

En este procedimiento no es necesario utilizar penicilinas puras; las nuevas sales amino-guanidínicas de penicilina pueden ser obtenidas partiendo de soluciones que contengan las penicilinas impurificadas o sales de las mismas, por ejemplo de extractos de disolventes o de extractos alcalinos. Estas sales pueden ser convertidas en los ácidos

⁴³⁶ Descrito el fundamento, el autor propone el siguiente ejemplo de realización práctica: en 450 cm³ de agua destilada se disuelven 150 g. de penicilina potásica; esta solución se diluye con 450 cm³ de alcohol etílico de 96°, a la solución diluida se le añade otra solución calentada a 50°-60° C. de 85 g. de diacetato de dibencil-etilén-diamina en 550 cm³ de alcohol etílico de 96° C. Se realiza una nueva dilución con 172 l. de agua destilada, se deja dos hora en reposo y se filtra, lavándola dos veces con 100 cm³ de alcohol de 50°. El producto obtenido se presenta en cristales en forma de placas, con punto de fusión entre 131°-132° C.

⁴³⁷ AHOEPM, patente 235.510; la memoria descriptiva consta de trece hojas, escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, a 17 de mayo de 1957; el expediente se corresponde con el de la solicitud presentada en Gran Bretaña, con fecha 18 de mayo de 1956, registro 15.549/56. La entidad figura domiciliada en Imperial Chemical House, Millbank, Londres (Inglaterra). La patente española fue concedida el 3-VI-1957 y publicada el 1-XII-1957.

penicilínicos libres, o en sales conocidas de penicilinas, por ejemplo las sales de sodio, potasio, calcio o procaína de penicilina⁴³⁸, de entre ellas es especialmente útil en terapéutica la sal de N-amino-N'-2:5-dimetil-guanidina de penicilina V. Estas sales pueden prepararse en forma de tabletas, suspensiones acuosas, polvos o soluciones o suspensiones en líquidos no acuosos, como por ejemplo dietil-acetamida⁴³⁹.

2.2.5.b. Derivados de dibencil-etileno-diamina [penicilina benzatina]

El 14 de septiembre de 1955 es una empresa española, *Antibióticos S.A.* quien presentará a registro un expediente para proteger, por veinte años, un “Nuevo procedimiento de obtención de derivados de penicilinas, insolubles o poco solubles en el agua”⁴⁴⁰.

Los autores indican que, para la obtención de derivados dibencil-etileno-diamínicos de penicilina, éstas se hacen reaccionar en forma de sales sódicas o potásicas, o su sal trietil-amínica en solución acuosa, con una disolución también acuosa de una sal de dibencil-etileno-diamina, preferentemente una sal de ácido orgánico, de las que, por su mayor solubilidad, es aconsejable usar el acetato.

Estos derivados presentan la ventaja de que, además de su acción prolongada, su actividad antibiótica es superior a la de la penicilina G frente a determinados microorganismos. La memoria incluye un par de ejemplos aclaratorios⁴⁴¹.

⁴³⁸ Como ejemplos de las nuevas sales a las que hace referencia este procedimiento se pueden citar las sales de penicilina G y penicilina V con N-amino-N'-fenil-guanidina, N-amino-N'-p-fenil-guanidina, N-amino-N'-m-cloro-fenil-guanidina, N-amino-N'-2.4-dimetil-fenil-guanidina, N-amino-N'-3.4-dimetil-fenil-guanidina, N-amino-N'-2,4-dicloro-fenil-guanidina y N-amino-N'-2,5-dimetil-guanidina.

⁴³⁹ Los autores acompañan la memoria técnica con diecisiete ejemplos; nos ocupamos del primero de ellos: se extrae, con 100 partes de éter, una mezcla de 3,85 partes de cloruro de N-amino-N'-2,4-dicloro-fenil-guanidina y 200 partes de solución 1 N de hidróxido sódico; el extracto etéreo se seca con sulfato sódico anhidro y luego se filtra; al filtrado se le adiciona una solución de ácido de penicilina G en 50 partes de cloroformo; a continuación se añade éter a la mezcla hasta conseguirse la precipitación completa de la sal resultante; luego se filtra la mezcla y el residuo se disuelve en dicloruro de etileno y se precipita de nuevo, por adición de éter, para originar la sal de N-amino-N'-2.4-dicloro-fenil-guanidina de penicilina G, con un punto de fusión entre 142°-144° C.

⁴⁴⁰ AHOEPM, patente 223.973, la memoria descriptiva consta de cuatro hojas, escritas a máquina por una sola cara; queda firmada, de manera apenas legible, en Madrid, a 14-IX-1955. La empresa tiene su domicilio en Madrid. La patente fue concedida el 7-XI-1955 y publicada el 16-XII-1955.

⁴⁴¹ De ellos comentamos el ejemplo 1: se disuelven, agitando en un vaso de precipitado, 28,5 g. de acetato de dibencil-etileno-diamina en 300 cm³ de agua; a continuación se añaden 0,6 g. de carboximetil-celulosa de viscosidad media y se sigue agitando hasta completar la disolución. En otro vaso, provisto de agitador mecánico, se disuelven 53,1 g. de sal sódica de fenoxi-metil-penicilina en 350 cm³ de agua; se agita fuertemente y se vierte sobre esta solución un chorro fino de acetato de dibencil-etileno-diamina, por medio de una bureta. Se provoca la aparición de un finísimo precipitado blanco, que va aumentando conforme se adiciona más líquido; terminada la adición, se enfría exteriormente con agua helada, continuando la agitación durante un cuarto de hora. El precipitado blanco y cristalino que se ha formado se filtra al vacío, empleando un embudo de vidrio poroso y un matraz kitasato. El producto obtenido se escurre bien, se lava con 50 cm³ de agua helada y, a continuación, con 45-50 cm³ de una mezcla de 25 partes de acetona y 75 partes de agua, se vuelve a escurrir y se seca al vacío, a la temperatura de 50°-60° C y presión de 2-5 mm. El producto obtenido presenta una actividad antibiótica de 1.120-1.160 U.I./mg. y responde a la fórmula de dipenicilina V-benzatina, teniendo dos moléculas de fenoxi-metil-penicilina por cada molécula de dibencil-etileno-diamina.

2.2.5.c. Derivados fenoxi-metílicos [penicilina V]

La administración de penicilinas por vía oral presentó muchos inconvenientes, entre otros el debido a que el producto se descomponía por el jugo gástrico; también la penicilina sufría una merma de actuación en el torrente circulatorio. Por lo tanto, esta vía, a pesar de la facilidad de su aplicación (excepto en el caso que el enfermo no pudiese deglutir), no se configura como práctica, pues el paciente tenía que realizar tomas muy seguidas, y en cada una de ellas ingerir gran cantidad de producto. En definitiva, las dificultades que supone el empleo seguro de la penicilina cuando se aplica por vía oral se resumen en las siguientes:

- 1º El jugo gástrico, al ser ácido, destruye la mayor parte de la penicilina.
- 2º Aunque se administrase la penicilina conjuntamente con sustancias alcalinas, la penicilina que salvase la barrera gástrica es inmediatamente inactivada por la penicilinasas intestinal.
- 3º El mal sabor del producto dificulta, en gran medida, su administración.
- 4ª Es necesario administrar grandes cantidades de penicilina, al menos cinco veces mayores que las dosis que se utilizan por vía parenteral.

Las distintas sales de la penicilina G, solubles e insolubles, son muy sensibles a la concentración de iones de hidrógeno, los cuales producen una destrucción química e inactivación biológica; por ello estas sales no son aptas para realizar tratamientos de penicilina por vía oral, salvo que se administren conjuntamente con grandes cantidades de sustancias estabilizadoras y antiácidas, pues la concentración de los iones hidrógeno en el estómago las ataca y destruye. Se puede establecer, respecto a la inactivación de las sales de penicilina, un orden que comienza con las sales sódicas y potásicas y va disminuyendo con las sales menos solubles, como son la procaína y la alumínica, siendo la sal de benzantina una de las menos afectadas.

La sal de penicilina más empleada para conseguir un efecto retardado es, en los años centrales del XX, el penicilinato de procaína; pero éste presenta ciertos inconvenientes: su componente básico es un anestésico muy empleado en la práctica médica y en algunos pacientes se observan efectos alérgicos. Otros ejemplos de sales de penicilina escasamente solubles en agua lo forman las sales de penicilina de alquilen-diaminas, tal como la N,N'-dibencil-etilén-diamina; pero esta sal presenta también la desventaja de contener un compuesto de amina, que puede tener efectos fisiológicos indeseables.

El ácido libre de penicilina en el cual su radical es un fenilo adquirió un gran interés pues tiene una gran estabilidad frente a los ácidos; por lo que se presenta especialmente útil para la administración oral; además, como el ácido libre de esta penicilina es poco soluble en agua, es de fácil preparación en su forma sólida cristalina, agregando un ácido mineral a la solución de una sal de un metal alcalino de dicha penicilina. Este tipo de penicilina fue denominada fenoxi-penicilina o fenoxi-metil-penicilina y queda representarla por la fórmula $R'C_9H_{11}N_2O_4S$.

El 12 de marzo de 1953, la empresa austriaca *Biochemie Gesellschaft* m.b.H. presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un "Procedimiento para la obtención de penicilinas estables, adecuadas

especialmente para la terapia oral⁴⁴², como responsables de este procedimiento figuran dos investigadores austriacos: Ernst Brandl y Hans Margreiter.

Los autores mantienen que las penicilinas de fórmula general $C_8H_{10}O_3NS-NHCO-(R_1X)_n-R_2$ [donde R_1 represente un radical bivalente alifático, dado el caso sustituido; X a un oxígeno, azufre o al grupo NH; n es un número entero de 1 a 5 y R_2 un radical aralifático y/o aromático], en contraposición de las penicilinas habituales, presentan una estabilidad elevada frente a la acción de los ácidos. Estas penicilinas, a un pH de 1-2 y a 24° C, no muestran, durante 48 horas, ningún descenso de su actividad, mientras que la penicilina G, con un pH de 2,1 y a 24° C, solo conserva su actividad, por término medio, durante 18 minutos.

Fundados en estos conocimientos, el procedimiento objeto de esta patente consiste en que las disoluciones impuras obtenidas en la fermentación y que contienen penicilinas de fórmula general $C_8H_{10}O_3NS-NHCO-(R_1X)_n-R_2$, se utilicen para separar estas penicilinas como ácidos libres. Este aislamiento puede realizarse sin ulterior purificación, con objeto de eliminar los ácidos precursores acompañantes, por ejemplo por medio de lavado con agua, precipitación etc.; pero también pueden purificarse las disoluciones antes de aislar los ácidos libres de las penicilinas, eliminando las impurezas, especialmente las cantidades residuales de ácidos precursores.

Mediante este procedimiento se logra obtener penicilinas como ácidos libres en forma cristalina definida. Los ácidos aislados presentan puntos de fusión determinados, son poco solubles en agua, pero se disuelven fácilmente en disoluciones tampón formando sales.

El procedimiento, según sus autores, se ha comprobado como excelente para la obtención de fenoxi-metil-penicilina, $C_8H_{10}O_3NS-NHCO-CH_2O-C_6H_5$, que se forma empleando beta-fenoxi-etanol o ácido fenoxi-acético como precursor en la fermentación. El ácido tiene un punto de fusión de 120°-128° C. Análogamente, con p-oxi-beta-fenoxi-etanol o con ácido p-oxi-fenoxi-acético como precursor, se obtiene un ácido cristalizado: p-oxi-fenoxi-metil-penicilina.

En el desarrollo de este procedimiento, las penicilinas obtenidas empleando precursores en la fermentación y con la estructura señalada, se separan de las disoluciones acuosas por acidificación con ácidos minerales a un pH inferior a 2, en forma insoluble cristalizada y se purifican, en todo caso, por lavado con agua, separándose al mismo tiempo los ácidos precursores acompañantes y sus sales. Esta precipitación ácida, aplicada sobre penicilina G, conduciría a la completa descomposición y a la formación de productos de descomposición biológicamente inactivos.

En el aislamiento de los ácidos libres de las penicilinas citadas, por extracción con disolventes orgánicos en presencia de ácidos, se emplean como medios extractivos aquellos disolventes orgánicos que fijan difícilmente los ácidos precursores, pero muy

⁴⁴² AHOEPM, patente 208.204; la memoria descriptiva consta de quince hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, a 12 de marzo de 1953. La empresa figura como residente en Ing. Etzelstrasse, 11 de Innsbruck (Tirol, Austria). La patente española fue concedida el 9-IV-1954 y publicada el 1-VI-1954.

fácilmente la penicilina, de manera que después de evaporar el disolvente orgánico y el lavado con agua se obtiene la penicilina en forma ácida y en estado puro⁴⁴³.

Si estas penicilinas se lavan, en presencia de ácidos, en disolventes orgánicos que fijan los ácidos libres acompañantes, lo que ocurre por ejemplo al emplear butanol para la extracción de la fase acuosa, entonces, por destilación azeotrópica, se expulsa primeramente una mezcla de agua y butanol y luego las mezclas butanólicas que se hacen cada vez más pobres en agua, quedando las penicilinas activas como ácidos libres, aunque impurificados con los ácidos precursores, pues estos ácidos, como por ejemplo el fenoxiacético ($pK=3,25$) presentan coeficientes pK análogos a los de las mismas penicilinas ($pK=3,12$ en fenoxi-metil-penicilina). Los ácidos penicilínicos obtenidos por precipitación o por evaporación del disolvente se purifican, si se desea, de los ácidos precursores acompañantes que se fijan por agua, mientras quedan prácticamente sin disolver los ácidos de las penicilinas.

Este tipo de penicilinas se pueden obtener como penicilinas alcalinas, partiendo de las disoluciones impuras y lograrlas en forma de ácidos libres, de manera que las sales alcalinas se disuelvan en agua y los ácidos penicilínicos se precipiten con ácidos, por ejemplo clorhídrico, quedando en disolución los ácidos precursores al emplear cantidades convenientes de agua. Las sales de las penicilinas pueden, desde la disolución impura, hacerse pasar por varios grados de extracción con cloroformo, eliminar por lavado con agua los ácidos precursores acompañantes y luego, con intermedio de una solución acuosa tampón ($pH\ 7,2$) en presencia de ácidos a un $pH\ 1,8$, llevarlas, por ejemplo, a acetato de butilo o acetato de amilo y obtener los ácidos libres por evaporación del disolvente.

Las disoluciones impuras y la fases acuosas de extracción pueden purificarse por adición de sales alcalino-térreas, por ejemplo sales de bario, pues las sales de bario de las penicilinas aquí tratadas son solubles en agua, pero las del ácido precursor son insolubles o muy poco solubles⁴⁴⁴; inmediatamente las penicilinas pueden llevarse a disolventes orgánicos, por ejemplo acetato de butilo, y precipitarse de esta disolución como sales alcalinas, por ejemplo como sales potásicas, mediante disolución alcohólica anhidra en acetato potásico; de las soluciones acuosas de las sales potásicas pueden luego precipitarse los ácidos libres de estas penicilinas con auxilio de ácidos inorgánicos, por ejemplo clorhídrico. Este método, aún sin previa precipitación de los ácidos acompañantes con sales alcalino-térreas, puede emplearse para la purificación de las disoluciones de las sales penicilínicas o de los ácidos libres de las penicilinas en disolventes orgánicos.

Las penicilinas obtenidas como ácidos libres se pueden, si se desea, convertir después en sales alcalinas o alcalino-térreas, por ejemplo por disolución en una cantidad

⁴⁴³ Los autores comentan que, cuando se emplea como precursor beta-fenoxi-etanol, que se oxida en ácido fenoxi-acético durante la fermentación aerobia, o el mismo ácido fenoxi-acético, se podrá trabajar con cloroformo como medio extractor, para cuyo disolvente existen mayores diferencias en las relaciones de distribución del ácido fenoxi-acético y de la fenoxi-metil-penicilina formada respecto a la fase acuosa. El ácido fenoxi-acético, con $pH\ 2,1$ y a $24^{\circ}C$, posee un coeficiente de dispersión de $0,48$, siempre que el cloroformo y la fase acuosa se mantengan en relación de $1:1$; con relación $6\ [agua] : 1\ [cloroformo]$, este coeficiente se eleva a $2,3$. La fenoxi-metil-penicilina posee, en conformidad con su insolubilidad en agua a $pH\ 2,1$ y su grandísima solubilidad en cloroformo, un coeficiente tan pequeño que en la extracción de las fases acuosas con cloroformo, la fenoxi-metil-penicilina pasa al cloroformo mientras que el ácido fenoxi-acético queda, en su mayor parte, en la fase acuosa.

⁴⁴⁴ Por ejemplo, el fenoxi-acetato de bario disuelve $1,4\ g.$ en $100\ cm^3$ de agua a $20^{\circ}C$.

equivalente de lejía y secado liófilo o precipitación de las penicilinas disueltas en el disolvente orgánico (acetato de butilo), mediante sales alcalinas de ácidos orgánicos, (acetato potásico) en presencia de un disolvente polar anhidro (etanol). Las sales alcalinas pueden también transformarse en aluminio-penicilinas, mediante sales de aluminio en disolución acuosa⁴⁴⁵.

⁴⁴⁵ Los autores presentan un ejemplo ilustrativo: para la fermentación se empleó una disolución alimenticia primitiva con la siguiente composición: 0,01% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4% de H_3PO_4 , 0,025% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01% de CaCl_2 , 3,0% de lactosa y 1,0% de glucosa; el trabajo fue realizado en un matraz de 5 l. con aireación, el cual se cargó con 2 l. de la solución alimenticia; ésta se componía de la disolución alimenticia primitiva y de las fuentes de nitrógeno, variantes en los distintos ejemplos y también de los diversos precursores. La cantidad de aire fue, aproximadamente, de 1 litro por minuto y por litro de disolución alimenticia. De las disoluciones impuras obtenidas con el empleo de las disoluciones alimenticias anteriores, u otras análogas, con auxilio de precursores del tipo $\text{HOOC}-(\text{R}_1\text{X})_n-\text{R}_2$ ó $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{R}_1\text{X})_n-\text{R}_2$ [teniendo R_1 , X , R_2 y n el significado comentado líneas arriba, en el texto], por ejemplo ácido p-nitro-fenoxi-acético, ácido fenil-mercapto-acético ($\text{C}_6\text{H}_5\text{SCH}_2\text{COOH}$), ácido p-oxi-fenoxi-acético ($\text{OHC}_6\text{H}_4\text{OCH}_2\text{COOH}$), ácido p-nitro-fenoxi-acético ($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{COOH}$) o fenoxi-etanol, se pueden obtener ácidos libre como sigue:

I. Preparación del ácido penicilínico libre de disolución acuosa con ácidos minerales: 6.000 cm^3 de la fase acuosa de penicilina (potencia 47.000 U.O./cm^3 determinada por ensayo yodométrico), se acidificaron a un pH de 1,5; la penicilina libre precipitada se filtró, se lavó con agua y se secó; rendimiento: 15,24 g. de fenoxi-metil-penicilina a 1.673 U.O./mg. ó 15,24 g. de fenoxi-etil-penicilina a 1.675 U.O./mg. ó 14,78 g. de p-oxi-fenoxi-metil-penicilina con 1.600 U.O./mg. (por ensayo yodométrico). Una posterior elaboración de las sales de penicilina puede realizarse como se indica: a) 7,62 g. del ácido penicilínico obtenido, con una potencia de 1.673 U.O./mg. , se disolvieron en 250 cm^3 de butanol y la penicilina se precipitó agregando 42 cm^3 de disolución 0,7 molar de acetato potásico; rendimiento: 0,08 g. de potasio-fenoxi-metil-penicilina con una potencia de 1.500 U.O./mg. (ensayo yodométrico); b) 7,62 g. de ácido penicilínico con una potencia de 1.673 U.O./mg. se neutralizaron con lejía de potasa N/2 por adición de 30 cm^3 de disolución al 10% de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; se separó aluminio-fenoxi-metil-penicilina; rendimiento: 6,95 g. con una potencia de 1.660 U.O./mg. (ensayo yodométrico).

II. Extracción del filtrado del cultivo con cloroformo, con lo que los acompañantes de la penicilina quedan en fase acuosa, evaporación inmediata del cloroformo: 3 litros de filtrado de cultivo desalbuminado, con una potencia de 1.200 U.O./cm^3 (determinada por ensayo yodométrico), se acidifican a un pH de 2,1 y se practica una extracción con 500 cm^3 de cloroformo; a continuación se efectuó la extracción con tampón, luego nuevamente con cloroformo y así sucesivamente, obteniéndose por último 50 cm^3 de la fase clorofórmica, con una potencia de 63.400 U.O./cm^3 ; el índice de acidez fue de 1,21. De esta fase clorofórmica se obtuvo, por evaporación del disolvente, la penicilina, que se presentó en forma ácida; de este modo se lograron 1,90 g. de fenoxi-metil-penicilina como ácido, con una potencia de 1.500 U.O./mg. ; una mayor purificación se logró en 100 cm^3 de agua, aspirando la penicilina así purificada; el rendimiento fue de 1,75 g. de penicilina ácida, con una potencia de 1.690 U.O./mg. (ensayo yodométrico).

III. Extracción y fuerte purificación de la fenoxi-metil-penicilina por precipitación del ácido fenoxi-acético como sal de bario: la penicilina contenida en 1.400 l. de filtrado de cultivo desalbuminado (potencia 1.053 U.O./cm^3 , determinada por ensayo yodométrico), se hizo pasar mediante el método de contracorriente, con reducción de volumen, por acetato de butilo con pH 2,5, luego nuevamente con disolución tampón con pH 7,2 y después, de nuevo, con acetato de butilo con pH 2,1. Se obtuvieron 60 l. de la fase de acetato de butilo con una potencia de 23.715 U.O./cm^3 (determinada por ensayo yodométrico). De la fase de acetato de butilo, la penicilina, mediante NaOH, se llevó a la fase acuosa (pH 7,2), volumen final 20 l.; esta disolución acuosa se trató con 1,7 kg. de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, precipitando fenoxi-acetato de bario; después de un reposo de una hora se separó por aspiración el precipitado y se lavó con 5 l. de agua. Los filtrados reunidos se trataron con 35 litros de acetato de butilo, empleando ácido sulfúrico se llevaron a un pH de 2 y la penicilina pasó al disolvente orgánico. La fase de acetato de butilo se secó con sulfato sódico, se filtró y el sulfato sódico se lavó con un poco de acetato de butilo. El ensayo yodométrico determinó que la potencia del compuesto era de 37.700 U.O./cm^3 ; volumen final, 37 litros. La relación ácida fue de 1:0,58; la reducción de la relación ácida de 1:5 a 1:0,58 significa una eliminación del ácido fenoxi-acético tan enérgica que de la fase de acetato de butilo se pudo precipitar directamente la penicilina con disolución de acetato potásico; de este modo se obtuvieron 986 g. de potasio-penicilina con una potencia de 1.350 U.O./mg. Este producto se disolvió en 25 l. de agua para purificarlo más y el ácido libre se separó acidificando a un pH de 1,5; el rendimiento fue de 7,48 g. de ácido penicilínico con una potencia de 1.685 U.O./mg.

Las penicilinas obtenidas por este procedimiento presentan una actividad próxima a la teórica; fenoxi-metil-penicilina y p-oxi-fenoxi-metil-penicilina, que presentan en la cadena lateral átomos con pares de electrones aislados o con un grupo metilénico activado, se comportan en la forma de ácidos, en los ensayos *in vitro*, biológicamente más activas que la penicilina G, con una potencia de 1.667 U.O./mg. La estabilidad ácida y, sobre todo, la mayor estabilidad en diversas condiciones, hace que los ácidos penicilínicos libres obtenidos según este procedimiento puedan considerarse como muy adecuados para la terapia oral.

El 12 de noviembre de 1955, la empresa española *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)*, presentó a registro una solicitud de patente de invención relativa a “Un procedimiento de obtención de una nueva sal de penicilina”⁴⁴⁶; se trata de la dipenicilina V-bezantina, un producto adecuado tanto para para la administración por vía oral -ya que tiene frente a las concentraciones fisiológicas y patológicas de los líquidos de la cavidad gástrica una estabilidad suficiente para garantizar el paso del producto antibiótico activo a la cavidad intestinal, de donde es rápidamente absorbido por el torrente circulatorio hasta los focos infecciosos- como para suspenderse en agua o en soluciones acuosas sin alterar perceptiblemente la concentración de iones hidrógeno, pudiendo por tanto ser inyectada por vía parenteral.

Su insolubilidad garantiza su persistencia durante un tiempo considerable en el punto de la inyección, lo que hace factible ciertas ventajas en el tratamiento terapéutico, como por ejemplo que la inyección de la dosis de 300.000 U.I. de penicilina determinen en el suero sanguíneo niveles o concentraciones antibióticas suficientes para combatir los gérmenes sensible durante una semana o más; que la dosis de 600.000 U.I. produzca niveles o concentraciones sanguíneas persistentes durante períodos de 15 días y que a dosis de 1.200.000 U.I. se produzcan niveles o concentraciones que tienen un mes o más de duración.

La sal de dipenicilina V-bezantina puede administrarse libremente por vía oral, bien en forma de polvo, bien en forma de suspensión preparada con gran antelación, sin perder de forma perceptible su potencia antibiótica durante períodos superiores a un año. Y con ella se pueden preparar suspensiones espesas, con una concentración de 300.000 U.I./cm³ ó 600.000 U.I./cm³ que, si se aromatizan convenientemente, se pueden aplicar por vía oral en la terapéutica infantil y que se mantienen en condiciones ordinarias a la temperatura ambiente, durante mas de un año, sin perder más de un 10% de su actividad. Esta nueva sal de penicilina, administrada por vía oral, se puede comparar con la penicilina V ácido en cuanto a su eficacia terapéutica, ya que, en las condiciones de hiperclorhidria o hiperacidez gástricas más intensas, sufre una merma por inactivación muy pequeña⁴⁴⁷.

⁴⁴⁶ AHOEPM, patente 224.971; la memoria descriptiva consta de ocho hojas mecanografiadas por una sola de sus caras, firmadas en Madrid a 12 de noviembre de 1955. La empresa está domiciliada en Madrid, en el número 95 de la calle Alcalá. La patente fue concedida el 23-XII-1955 y publicada el 1-II-1956.

⁴⁴⁷ Los autores han experimentado el suspenderla en agua a pH 2,8 y, comparadas las pérdidas sufridas ante esta elevada concentración de iones de hidrógeno con las de una suspensión de penicilina V ácido realizadas en idénticas condiciones, muestran resultados similares. Estos ensayos experimentales fueron repetidos en la clínica, comprobándose que las concentraciones sanguíneas de penicilina que se obtenían después de la administración oral de la sal de dipenicilina V-bezantina, son comparables, en cuanto a intensidad y duración, a las obtenidas con el ácido fenoxi-metil-penicilínico o penicilina V ácido.

El procedimiento de obtención de dipenicilina V-bezantina se basa en hacer reaccionar penicilina V ácida con bezantina base, en un disolvente adecuado y en concentraciones suficientes para que, al juntarse ambos líquidos, se exceda la penicilina V benzatina. En el proceso de obtención de penicilina V ésta es extraída, por medio de disolventes orgánicos, en forma de penicilina V ácido. Por lo tanto, el procedimiento objeto de esta patente resulta ventajoso para la obtención de la nueva sal dipenicilina V benzatina, ya que no es necesario aislarla en forma de sales alcalinas para obtener sales dibencil-etilén-diamídicas de la penicilina V.

Además, como la penicilina V ácido se puede disolver en numerosos medios orgánicos (acetona, cloroformo, acetato de amilo, acetato de butilo) y la base amínica de benzatina también es soluble en disolventes orgánicos, resulta que el procedimiento objeto de esta patente tiene un campo de acción bastante amplio y permite que la nueva sal sea obtenida con facilidad y en gran estado de pureza dentro de numerosas posibles combinaciones.

Elegidos convenientemente los disolventes en que se verifique la síntesis total del compuesto y dada la gran volatilidad muchas veces común a los disolventes orgánicos, la desecación final del compuesto que se obtiene se logra en poco tiempo y con gran comodidad, con o sin ayuda del vacío, a temperaturas relativamente bajas, con lo cual no se corre el peligro de inactivar el producto obtenido. Al ser la benzatina una base soluble, en todas las proporciones, en gran número de disolventes orgánicos, al realizar el trabajo de síntesis se dispone de un margen muy amplio de concentraciones y diluciones en lo referente a los líquidos madre que aporten a la reacción final la molécula bezantínica⁴⁴⁸.

El 11 de octubre de 1956 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó, ante el registro español de patentes, su invención para proteger, por veinte años, “Un método de fabricación de una sal cristalina de la fenoxi-metil-penicilina”⁴⁴⁹; procedimiento diseñado por el ingeniero químico danés Erling Juhl Nielsen⁴⁵⁰.

El autor mantiene que mientras las sales de los metales alcalinos o alcalino-térreos de la fenoxi-metil-penicilina son relativamente solubles en el agua⁴⁵¹, la

⁴⁴⁸ Los autores proponen un par de ejemplos de síntesis de la nueva sal, nos ocupamos del primero de ellos: 170 cm³ de cloroformo se disuelven, a temperatura ambiente y mediante agitación, en 7,03 g. de penicilina V ácido; en otro recipiente, que contiene 100 cm³ de cloroformo, se disuelven 2,40 g. de benzatina base. Se unen ambas soluciones y, al cabo de cierto tiempo, se produce un precipitado cristalino de la nueva sal dipenicilina V-bezantina.

⁴⁴⁹ AHOEPM, patente 231.298; la memoria descriptiva consta de cinco páginas escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, a 11 de octubre de 1956. La patente se presenta bajo prioridad británica, número 29.909/55 del 19 de octubre de 1955. La empresa figura como residente en 19, Bronshøjvej. Copenhagen (Dinamarca). La patente española fue concedida el 12-III-1957 y publicada el 16-V-1957.

⁴⁵⁰ En el momento de presentar la documentación [1957], figura como residente en Værnersvej, 7, Charlottenlund (Dinamarca).

⁴⁵¹ Los autores remiten a la patente británica 643.514, relativa al método de producción de nuevas penicilinas, que incluye hacer crecer un moho que produce penicilina en un medio de cultivo que contiene una cantidad efectiva de precursor de menos de 1%, representado por la fórmula: R-(CH₂)_n-R', [n representa un número entero entre 1 y 5, ambos inclusive; R un radical orgánico que no sea radical de buten-1-il, n-butil, n-hexil, fenil o p-hidroxifenil; R' un grupo de ácido carboxílico o derivados funcionales del mismo, tales como un grupo carboxi, carboxi-éster, carboxi-sal o carboxi-amida, carbinol,

solubilidad de la sal cálcica de la fenoxi-metil-penicilina en agua es muy baja⁴⁵². Debido a esta baja solubilidad se pueden obtener efectos penicilínicos prolongados mediante inyección intramuscular de suspensiones de esta sal. El empleo de estas sales cálcicas de fenoxi-metil-penicilina ofrece la ventaja de lograr un efecto prolongado sin el uso de sales de penicilina con bases orgánicas, como por ejemplo la procaína, cuyas bases pueden causar supersensibilidad en algunos individuos.

La sal cálcica de fenoxi-metil-penicilina se puede producir haciendo reaccionar una solución que contenga una sustancia capaz de suministrar iones de fenoxi-metil-penicilina con una sal cálcica o con un hidróxido cálcico. La reacción se realiza en medio acuoso o en un solvente orgánico en el cual el ácido libre de fenoxi-metil-penicilina, o la sal correspondiente, sea soluble y pueda contener cierta cantidad de agua. Cuando la fenoxi-metil-penicilina reacciona con una sal cálcica, la sal tiene que ser la de un ácido que tenga una constante de disociación inferior a la del ácido penicilínico; cuando se emplea el ácido libre de la penicilina en forma de una solución del mismo en acetato de butilo o de amilo, tal como se obtiene durante el método normalmente empleado en la concentración y purificación de la penicilina cruda que se forma en el medio de cultivo, esta solución se puede tratar con una solución acuosa o una suspensión de hidróxido cálcico, en este último caso removiendo la mezcla enérgicamente. Si se emplean sales de fenoxi-metil-penicilina solubles en agua, esto es sales de sodio, potasio o amonio, o una sal de amina, por ejemplo la sal de la ciclohexil-amina, conviene obtener la sal cálcica mezclando una solución acuosa de la sal de penicilina con una solución de una sal cálcica, como podría ser el cloruro sódico. También se puede obtener la sal cálcica de fenoxi-metil-penicilina tratando una solución acuosa de la sal amónica de fenoxi-metil-penicilina con una suspensión acuosa de hidróxido cálcico, preferentemente añadiendo la suspensión poco a poco; este procedimiento tiene la ventaja de que el amonio que se libera durante la reacción se elimina de la mezcla por evaporación⁴⁵³.

Apenas unos días después, el 29 de noviembre de éste 1956, la misma empresa danesa, *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, presentará ante el registro español un certificado de adición por: “Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 231.298, solicitada en 11 de octubre de 1956, por ‘Un método de fabricación de una sal

carbilamina, acetal o un grupo de aldehído; R y R' no pueden ser iguales. En esta patente R puede representar un radical fenoxi, unido a una porción $-(CH_2)_n-R'$ del compuesto precursor por oxígeno].

⁴⁵² La solubilidad de la sal cálcica de la fenoxi-metil-penicilina en agua, en un pH ca. 7, es de 5,7 g./litro, a una temperatura de 20° C. La solubilidad en etanol anhidro es de 2,8 g./litro de agua a la misma temperatura. Esta sal, secada al vacío sobre pentóxido fosfórico, contiene 4,21% de agua, lo que parece indicar que la molécula de la sal está hidratada con una molécula de agua.

⁴⁵³ El autor ilustra su procedimiento con un ejemplo aclaratorio: a 365 cm³ de agua se añaden 10 cm³ de una solución acuosa 2 N de acetato de sodio; en esta mezcla se disuelven 58,5 g. de fenoxi-metil-penicilina. El acetato de sodio presente tiene por objeto mantener el pH de la solución resultante entre 7 y 8, pues el cloruro de calcio puede contener algo de ClH. Después se añaden 60 cm³ de una solución acuosa medio saturada de cloruro cálcico, removiendo lentamente. Se forman unos cristales que precipitan; se lavan con agua, después con acetona y, por último, se secan al vacío sobre pentóxido fosfórico. Se obtienen 55,0 g. de producto con una actividad de 1.554 U.I./mg., según determinación yodométrica.

cristalina de la fenoximetil-penicilina⁴⁵⁴, atribuido, como la patente principal, al ingeniero químico danés Erling Juhl Nielsen⁴⁵⁵.

Este procedimiento se refiere a una sal cálcica, sólida y cristalina de fenoxi-metil-penicilina que corresponde a la fórmula Pen_2Ca , en la cual Pen representa a la fenoxi-metil-penicilina, cuyos cristales contienen 4%-5% de agua de cristalización. El procedimiento apenas presenta diferencias frente a la patente que sirve de referencia⁴⁵⁶; se caracteriza porque una solución conteniendo iones de fenoxi-metil-penicilina se hace reaccionar con una sal cálcica o hidróxido de calcio, en presencia de suficiente cantidad de agua para garantizar la formación del dihidrato de la sal cálcica resultante de fenoxi-metil-penicilina; la reacción se efectúa en una solución acuosa o en una solución orgánica que contenga la suficiente cantidad de agua.

El nuevo producto se puede emplear para la administración oral, en forma de tabletas; tales tabletas pueden contener el dihidrato cristalino cálcico de fenoxi-metil-penicilina mezclado con suficientes cantidades de fécula de patata, caolín ligero, gelatina o talco. Alternativamente, el producto podría utilizarse para inyecciones subcutáneas o intramusculares; en este caso, la superficie de los cristales podrá recubrirse con una capa de lecitina y suspenderse en una solución viscosa acuosa de carboxi-metil-celulosa. También se pueden añadir a la solución sustancias micro-orgánicas inhibitoras de crecimiento, tales como nitrato-fenil-mercúrico.

Y pocos días más tarde, el 6 de diciembre de éste 1956, la misma empresa, la danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, volvió a solicitar un segundo certificado de adición, sobre “Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal, N° 231.298, solicitada en 11 de octubre de 1956 por ‘Un método de fabricación de una sal cristalina de la fenoxi-metil-penicilina’⁴⁵⁷”, también atribuido, como la patente principal, al ingeniero químico danés Erling Juhl Nielsen⁴⁵⁸.

Los perfeccionamientos y mejoras introducidos en el objeto de la patente principal los refleja el autor en una serie muy dilatada de ejemplos, en los que se insiste en la misma línea de trabajo señalada en la patente principal, a la que complementan⁴⁵⁹.

⁴⁵⁴ AHOEPM, patente 232.214; la memoria descriptiva consta de ocho páginas escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, a 29 de noviembre de 1956. La patente se presenta bajo prioridad británica número 34.334/55 del 30 de noviembre de 1955. La empresa figura como residente en 19, Bronshøjvej, Copenhagen (Dinamarca). La patente española fue concedida el 25-III-1957 y publicada el 1-VII-1957.

⁴⁵⁵ El cual mantiene su domicilio en Værnersvej, 7, Charlottenlund (Dinamarca).

⁴⁵⁶ El autor reproduce, en esta memoria, el mismo ejemplo –con las mismas cantidades– que había presentado en la patente principal (cf. AHOEPM, patente 231.298).

⁴⁵⁷ AHOEPM, patente 232.323; la memoria descriptiva consta de once hojas escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, a 6 de diciembre de 1956. La patente se presenta bajo prioridad británica del 30 de diciembre de 1955, número 37.443/55. La empresa figura como residente en 19, Bronshøjvej, Copenhagen (Dinamarca). La patente española fue concedida el 12-III-1957 y publicada el 1-VII-1957.

⁴⁵⁸ Mantiene su domicilio en el número 7 de Værnersvej, Charlottenlund (Dinamarca).

⁴⁵⁹ He aquí algunos ejemplos significativos: se disuelven 1,2 g. de lecitina en 60 cc. de éter y la solución se esteriliza a través de un filtro de vidrio; a la solución esterilizada se le añaden 60 g. de fenoxi-metil-penicilina en forma de sal cálcica, también estéril, con un tamaño de partícula comprendido entre 20-60 micras; es necesario que todas las partículas estén mojadas con el líquido, a partir de lo cual se elimina el éter por evaporación en vacío o en un tamiz cuyo ancho de malla sea de 0,13 mm. Por otra

El 23 de abril de 1957, la empresa británica *Imperial Chemical Industries Limited* presenta, ante el registro español de patentes, una solicitud para proteger, por veinte años, un “Procedimiento de separación de sales de metal alcalino de fenoxi-metil-penicilina”⁴⁶⁰; comprende éste el tratar la solución acuosa de una sal de metal alcalino de fenoxi-metil-penicilina con una sal del metal alcalino correspondiente. Como sal adecuada de metal alcalino de la fenoxi-metil-penicilina se señala la fenoxi-metil-penicilina potásica y, como sal del metal alcalino correspondiente, por ejemplo, el acetato de potasio o el cloruro potásico⁴⁶¹.

La sal del metal alcalino, por ejemplo el citado acetato potásico, puede usarse en forma sólida o anhidra y, según este procedimiento, se añade esta sal a una solución acuosa y agitada de la sal de metal alcalino de fenoxi-metil-penicilina. La sal de metal alcalino se disuelve en la solución acuosa de la sal alcalina de la fenoxi-metil-penicilina y esta sal se separa de la solución en forma incolora y cristalina.

Los autores recomiendan emplear, como material de partida, una solución acuosa de una sal de metal alcalino de penicilina V tal que, por mililitro, estén presentes entre 100.000 U.I. y 200.00 U.I. de penicilina V, y añadir una cantidad suficiente de la sal del metal alcalino correspondiente a la solución de penicilina V, en cantidad tal que,

parte, 2,7 g. de carboxi-metil-celulosa se disuelven en agua; la solución obtenida se calienta a 120° C durante 20 minutos, adicionándole en ese momento acetato fenil-mercúrico, hasta conseguir una concentración de esta sustancia de 1:20.000. Se toman 30 g. de sal cálcica de fenoxi-metil-penicilina tratada con lecitina, y se le adicionan 50 cc. de la solución estéril de carboxi-metil-celulosa, agitando hasta conseguir una suspensión uniforme; a continuación se añaden otros 50 cc. de la solución indicada para conseguir un volumen total de 100 cc. de la solución final, que se homogeniza en un aparato *ad hoc*. La suspensión resultante contiene 300 mg./cc. de sal sódica. El autor empleó estas suspensiones para inyecciones intramusculares, y determinó las concentraciones de penicilina en el suero después de ciertos intervalos de tiempo; cada inyección contenía 200 mg. de la sal cálcica de fenoxi-metil-penicilina; comparó estos resultados con los de las concentraciones de bencil-penicilina en el suero tras una inyección de 300 mg. de procaína-bencil-penicilina: los resultados mostraron que, durante las dos primeras horas, la sal de calcio produce concentraciones de penicilina mayores en el suero que las que produce la sal de procaína de la bencil-penicilina y que la sal de calcio tiene un efecto prolongado algo menos pronunciado que las sales de bencil-penicilina-procaína.

El procedimiento de obtención de las preparaciones para uso oral lo explica el autor mediante el ejemplo que se indica: una cantidad de 200 g. de la nueva sal de calcio de fenoxi-metil-penicilina se mezcla con 60 g. de almidón de patata y 20 g. de caolín; la mezcla se granula con una solución acuosa de 4% de gelatina y, a continuación, se seca el granulado. Después se mezcla con 35 g. de almidón de patata y 35 g. de talco; la mezcla se analiza y se comprime en tabletas de tal peso que, cada tableta, contenga 200 mg. de fenoxi-metil-penicilina. Administró, a cada sujeto del ensayo, por vía oral, una de tales tabletas; comparó las concentraciones en el suero, a ciertos intervalos de tiempo, obtenidas al administrar tabletas de fenoxi-metil-penicilina en forma de sal cálcica con fenoxi-metil-penicilina dada en forma de sal potásica; se deduce del estudio que la sal cálcica es equivalente, en su acción, a la sal potásica.

⁴⁶⁰ AHOEPM, patente 234.998; la memoria descriptiva consta de ocho hojas, escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, el 23 de abril de 1957; el expediente se corresponde con el de la solicitud presentada en Gran Bretaña, con fecha 2 de mayo de 1956, nº 13.519/56. La entidad figura domiciliada en Imperial Chemical House, Millbank, Londres (Inglaterra). La patente española fue concedida el 30-IV-1957 y publicada el 16-XI-1957.

⁴⁶¹ El empleo de acetato potásico como sal del metal alcalino tiene la ventaja de ser fácilmente soluble en etanol, mientras que la fenoxi-metil-penicilina potásica es relativamente insoluble en ese disolvente, lo que permite que la fenoxi-metil-penicilina potásica aislada pueda liberarse fácilmente de las trazas de acetato potásico, lavando con etanol el material aislado.

en la mezcla de reacción resultante, exista una concentración aproximada del 30% de la sal del metal alcalino correspondiente⁴⁶².

Las sales de metal alcalino de penicilina V que se obtiene por este procedimiento están libres -o prácticamente libres- de impurezas coloreadas y sus potencias, determinadas por ensayo iodométrico, son considerablemente más elevadas que las que presentan las sales de metal alcalino de penicilina V utilizadas como material de partida⁴⁶³.

El 29 de agosto de 1957, la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó, ante el registro español de patentes, un procedimiento para proteger, por veinte años, “Un método para la purificación de fenoxi-metil-penicilina”⁴⁶⁴, un procedimiento diseñado por el ingeniero químico danés Erling Juhl Nielsen⁴⁶⁵.

Según este autor, el rendimiento en bencil-penicilina se aumenta grandemente cuando se añade ácido fenil-acético al cultivo del medio donde se produce penicilina. Cuando se origina fenoxi-metil-penicilina se puede utilizar, como precursor, ácido fenoxiacético o beta-fenoxi-láctico en lugar de ácido fenil-acético; como queda siempre un exceso de ácido fenoxi-acético o de beta-fenoxi-láctico en el medio de cultivo, después de que la fermentación ha terminado, cierta cantidad de bencil-penicilina se forma cuando se emplea ácido fenoxi-acético como precursor; es poco deseable que estas tres sustancias estén presentes conjuntamente con la fenoxi-metil-penicilina. Cuando se aísla bencil-penicilina del medio de cultivo mediante una de sus sales con aminas, se observa una separación completa de su inevitable exceso de ácido fenil-acético, porque las sales de estos ácidos, con muchas de las aminas corrientemente usadas, son solubles en solventes orgánicos.

El autor señala que la N,N'-di-isopropil-beta-hidroxi-etilamina forma una sal con la fenoxi-metil-penicilina que es muy poco soluble en solventes orgánicos, mientras que sus sales con ácido fenoxi-acético, ácido beta-fenoxi-acético y bencil-penicilina son fácilmente solubles en dichos solventes. Este hecho hace posible el aislamiento de fenoxi-metil-penicilina de los medios de cultivo que la contienen por adición de ácido fenoxi-acético o beta-fenoxi-acético.

⁴⁶² La solución acuosa de la sal del metal alcalino de fenoxi-metil-penicilina, utilizada como reactivo inicial, puede obtenerse por cualquier método conocido. Los autores citan, a modo de ejemplo, el disolver una sal de metal alcalino de fenoxi-metil-penicilina en agua o bien apurando una solución de disolvente orgánico, por ejemplo una solución en acetato de butilo que contenga fenoxi-metil-penicilina, con una solución acuosa de un bicarbonato de metal alcalino, por ejemplo bicarbonato potásico.

⁴⁶³ Para aclarar este procedimiento, los autores proponen siete ejemplos no limitativos, comentamos el primero de ellos: se añaden tres partes de acetato potásico anhidro a una solución agitada de una parte de fenoxi-metil-penicilina potásica con una potencia de 1.140 U.I./mg., en diez partes de agua, realizando la operación durante un tiempo de 5 minutos; la mezcla se agita durante 10 minutos, a continuación se filtra y el residuo sólido se lava dos veces con una parte en volumen de etanol cada vez; luego se seca en un secador de vacío. Se obtiene fenoxi-metil-penicilina potásica cristalina, de una concentración de 1.560 U.I./mg., determinada por ensayo iodométrico.

⁴⁶⁴ AHOEPM, patente 237.344; la memoria descriptiva consta de cinco hojas, escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid a 29 de agosto de 1957. El expediente se corresponde al presentado en Dinamarca, bajo registro 3116/56 del 4 de septiembre 1956. La empresa figura establecida en el número 19 de Bronshøjvej, Copenhagen (Dinamarca). La patente española, de invención, fue aprobada con fecha de 15-X-1957 y publicada el 16-XII-1957.

⁴⁶⁵ En el momento de presentar la documentación [1957], figura como residente en Værnersvej, 7, Charlottenlund (Dinamarca).

Durante este procedimiento el medio de cultivo es acidificado a un pH en el cual la fenoxi-metil-penicilina se encuentra en su estado libre. El medio de cultivo acidificado se extrae con un solvente orgánico poco soluble en agua y, a continuación, se adiciona N,N'-di-isopropil-beta-hidroxi-etil-amina al extracto; la sal así formada se separa de la solución, o bien la solución orgánica obtenida se extrae con una solución tampón; la solución acuosa se separa con un solvente orgánico poco soluble en agua, después de lo cual la N,N'-di-isopropil-beta-hidroxi-amina se añade a la solución orgánica y la sal se aísla de la solución.

La fenoxi-metil-penicilina libre se puede obtener de la sal tratándola en una suspensión o solución acuosa con un ácido fuerte, puesto que la fenoxi-metil-penicilina es muy poco soluble en agua y no se descompone por los ácidos⁴⁶⁶.

El 29 de enero de 1959, la empresa danesa *Novo Therapeutisk Laboratorium A/S* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a "Un procedimiento de purificar penicilina V"⁴⁶⁷.

En la producción de penicilina V por fermentación, se adiciona, al líquido de fermentación, ácido fenoxi-acético, en una cantidad mayor -a veces considerablemente mayor-, que la que es necesaria para formar penicilina V; por lo tanto, una vez terminado el proceso, el líquido de fermentación contiene cantidades grandes de una sal acuosa de ácido fenoxi-acético, generalmente en forma de su sal sódica.

Se han encontrado dificultades al eliminar el ácido fenoxi-acético, que inevitablemente acompaña a la penicilina V durante la purificación inicial cuando, en el tratamiento de la fermentación para recuperar y purificar penicilina V, se emplean los métodos habituales de recuperación y purificación de penicilina G. Este procedimiento trata de solventarlos precipitando la penicilina V en forma de una sal ligeramente soluble en agua, sin que ocurra simultáneamente la precipitación del ácido fenoxi-acético.

El procedimiento parte de una solución acuosa impurificada de una sal de penicilina V, la cual reacciona con una sal de N,N'-dibencil-etileno-diamina, que es más soluble que la sal de dipenicilina V de esta diamina, con precipitación simultánea de la sal últimamente mencionada. Los autores mantienen que así no se efectúa precipitación simultánea de la sal de ácido fenoxi-acético y la amina aludida; pero la sal de penicilina

⁴⁶⁶ El autor ilustra el procedimiento mediante el siguiente ejemplo: a un medio de cultivo que contiene fenoxi-metil-penicilina y ácido fenoxi-acético en exceso respecto a la cantidad utilizada por el moho productor de penicilina, se añade ácido fosfórico hasta conseguir un pH 2, después de lo cual el medio se extrae con acetato de n-butilo. El extracto obtenido se trata con una solución acuosa de tampón a base de fosfato sódico con un pH de 6,5; este nuevo extracto se vuelve a tratar con un volumen inferior de acetato de n-butilo al que se ha empleado en la primera extracción. El resultado contiene 63.0000 U.I./ml. (potencia determinada por el método yodométrico) y además impurezas coloreadas. A 100 ml. de esta última solución se la añaden 7,05 g. de N,N-di-isopropil-beta-hidroxi-etil-amina; la mezcla se agita a temperatura ambiente durante dos horas. Los cristales que se van formando se separan de la solución sobre un filtro, se lavan con acetona y se secan a temperatura ambiente. El rendimiento obtenido es de 4,1 g., con una potencia de 1.215 U.I./mg.

⁴⁶⁷ AHOEPM, patente 246.912; la memoria descriptiva consta de ocho páginas escritas por una sola cara, firmadas en Madrid a 29 de enero de 1959. El expediente se corresponde al presentado en Dinamarca, con fecha de 30 de enero de 1958, bajo el número 321/58. La empresa figura como establecida en el 115 de Fuglebakkevej, Copenhagen (Dinamarca). La patente española, de invención, fue aprobada con fecha de 30-III-1959 y publicada el 1-VI-1959.

V de la amina precipita en forma de cristales de tamaño muy pequeño (*ca.* 1-2 micrones), cuyo aislamiento y lavado exige mucho tiempo. La pureza de los cristales deja mucho que desear si la mencionada reacción se verifica mezclado la solución acuosa impura de una sal de penicilina V y una solución acuosa de una sal de N,N'-dimetil-etilén-diamina. La reacción indicada tiene lugar en un medio que contiene una mezcla de disolvente orgánico miscible con agua⁴⁶⁸ y un disolvente orgánico inmiscible⁴⁶⁹.

Aunque no es absolutamente necesario en el procedimiento, es preferible que los dos disolventes orgánicos estén presentes en una proporción tal, en el medio de reacción, que este último forme una fase homogénea al comienzo de la reacción, pero se separe en dos fases durante la misma, estando constituida una de las fases por una mezcla de agua y el disolvente orgánico miscible junto a la parte principal de las impurezas presentes, mientras que la otra fase constituye el disolvente orgánico inmiscible con agua junto con la sal de dipenicilina V de la diamina precipitada. De este modo se precipitan cristales mayores, aciculares, de tamaño de hasta 50 micrones, siendo más puros y fáciles de aislar y lavar; los cristales tienen mayor afinidad por la fase orgánica que por la fase acuosa, lo que permite obtener una pasta de cristales y disolvente orgánico con un contenido de agua bajo, que puede ser importante para el empleo posterior de los cristales.

La proporción entre los dos disolventes orgánicos, para obtener un medio de reacción, depende del contenido de agua del medio de reacción y del contenido de sales e impurezas en la solución acuosa impurificada de la sal de penicilina V, actuando dichas sales e impurezas como solubilizantes. Los cristales precipitados son tanto mayores cuanto más elevado sea el contenido del disolvente orgánico inmiscible con agua en el medio de reacción; por lo tanto, es conviene un contenido, en el medio de reacción del disolvente orgánico inmiscible con agua, de alrededor de un 25% en volumen.

La solución acuosa bruta de la sal de penicilina V, utilizada como material de partida, se obtiene por una purificación inicial del filtrado del tanque de fermentación, después de terminada ésta, acidificando este filtrado mientras se añade un disolvente orgánico inmiscible con agua, tal como el acetato de butilo, con lo cual se libera el ácido libre de penicilina V y se disuelve en el disolvente orgánico. Después de la separación de la fase acuosa, se neutraliza el disolvente orgánico añadiendo una solución acuosa de NaHCO₃ y Na₃OH; de esta manera se neutraliza el ácido libre de penicilina, formándose la sal sódica acuosoluble y, después de la separación del disolvente orgánico, se tiene de nuevo una sal acuosa de penicilina V. Esta purificación inicial, realizada en dos fases, puede repetirse las veces que convenga⁴⁷⁰.

⁴⁶⁸ Como disolventes orgánicos miscibles en agua pueden usarse alcoholes alifáticos como metanol, etanol y propanol, o cetonas alifáticas tales como acetona y butanona; el más barato y más asequible es el etanol, por lo que es el preferido.

⁴⁶⁹ Como disolventes orgánicos inmiscibles en agua conviene usar aquellos que tengan una densidad menor que la del agua, por lo que junto con la sal de penicilina V precipitada se acumulen en la parte superior del recipiente de reacción, mientras que la fase acuosa, conteniendo las impurezas, se dispongan en el fondo, lo que permite una fácil separación de las dos fases; entre los recomendados por los autores de este procedimiento figuran el acetato de butilo, acetato de amilo y benceno; de estos tres el preferido es el acetato de butilo; otros ejemplos de disolventes orgánicos inmiscibles en agua son el cloroformo y el tricloro-etileno.

⁴⁷⁰ Los autores proponen un caso práctico: a una mezcla de 25 ml. de etanol del 96% y 25 ml. de acetato de butilo, en la que hay disueltos 2,5 g. de di-acetato de N,N'-dibencil-etilén-diamina, se añaden

El 4 de abril de 1959, esta misma empresa danesa, *Novo Therapeutisk Laboratorium A/S*, presentó ante el registro español de patentes, un nuevo expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a “Un procedimiento para preparar la sal potásica de penicilina V y G”⁴⁷¹. Este procedimiento se caracteriza porque la disal de la penicilina V ó G y la N,N'-di-bencil-etilén-diamina se hacen reaccionar con acetato potásico, en un medio de reacción que contenga un alcohol alifático con uno a cuatro átomos de carbono⁴⁷². El acetato potásico es soluble en estos alcoholes anhidros, pero la sal potásica de la penicilina V y G es débilmente soluble en ellos.

El procedimiento operativo que se estudia no requiere emplear un medio anhidro de reacción. El contenido de agua depende de la cantidad de acetato potásico que se emplee, disminuyendo la solubilidad de la sal potásica de penicilina V y G y aumentando la solubilidad de la sal de dipenicilina G de la citada diamina al aumentar la concentración de acetato potásico. Si la reacción tuviese lugar en etanol, en presencia de la máxima cantidad de acetato potásico disuelto, el medio de reacción puede contener, durante la formación de la sal potásica de penicilina V, hasta un 20% de agua, obteniéndose sin embargo un rendimiento del 95%. Durante la formación de la sal potásica de la penicilina G, el contenido en agua debe ser lo más bajo posible. La presencia de nuevas cantidades de agua dará lugar a rendimientos decrecientes, particularmente de la sal potásica de penicilina G.

50 ml. de una solución acuosa bruta de penicilina V sódica que contiene aproximadamente 150.000 U.I./ml. No hay separación del acetato de butilo porque las sustancias orgánicas mantienen el acetato de butilo en solución. La solubilidad en la mezcla producida de la sal de dipenicilina V de la diamina presente es relativamente grande, pero no mayor que la mezcla que está algo sobresaturada con relación a la sal mencionada, de manera que esta última comienza a cristalizar en el plazo de 5 a 10 minutos. Al eliminar la sal de la mezcla de reacción, disminuye la solubilidad del acetato de bencilo y comienzan a formarse dos fases; de este modo, la solubilidad de la sal de penicilina V disminuye, de manera que continúa su cristalización y se termina en un período de 10 a 20 minutos. La sal de penicilina cristalizada se acumula, en la fase de acetato de butilo, en la parte superior: la fase acuosa clara, inferior, contiene aproximadamente 30% de etanol y algo de acetato de butilo, junto con una cantidad de penicilina equivalente a la que corresponde a la solución de la sal de penicilina cristalizada en el medio acuoso alcohólico. Diluyendo la fase acuosa con 50-100 ml. de agua, tiene lugar una nueva separación de acetato de butilo y cristalización de la sal de penicilina; al cabo de un breve reposo, se separa la fase acuosa; esta fase acuosa tiene un contenido de 5% a 10% de la cantidad total de penicilina. La fase de acetato de butilo, con los cristales precipitados, se centrifuga o se filtra y los cristales se lavan con acetato de butilo, en parte para separar el acetato de butilo adherente y, en parte, para eliminar la mayor cantidad de agua posible; las pérdidas producidas por este lavado son mínimas, puesto que los cristales son ligeramente solubles en acetato de butilo. El rendimiento es de 90%-95% del teórico y los cristales contienen alrededor de 1.100 U.I./mg. de penicilina. Los cristales producidos pueden emplearse para la producción de otras sales de penicilina V de uso terapéutico.

En la realización que se acaba de describir, se utiliza un exceso del di-acetato de la diamina mencionada en relación con el contenido de penicilina en la solución acuosa impurificada de la sal sódica de penicilina V; generalmente puede utilizarse una cantidad doble del di-acetato de la diamina frente a la cantidad de penicilina, sin que se produzca precipitación de fenoxi-acetato de la diamina empleada.

⁴⁷¹ AHOEPM, patente 248.442; la memoria descriptiva consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola cara, fechadas en Madrid, a 4 de abril de 1959. El expediente se corresponde al presentado en Dinamarca, el 10 de abril de 1958, bajo el número 1.320/58. La empresa figura establecida en el 115 de Fuglebakkevej, Copenhague (Dinamarca). La patente española, de invención, fue aprobada con fecha de 14-V-1959 y publicada el 16-VIII-1959.

⁴⁷² Los alcoholes empleados son los siguientes: metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y butanol; el menos apropiado es el metanol, con respecto a la obtención de rendimientos elevados.

Cuando se forma la sal potásica de la penicilina V, lo más apropiado es que el medio de reacción tenga un contenido en agua como máximo del 10%. Ello permite utilizar un exceso limitado de acetato potásico, que facilita la filtración de la sal potásica de penicilina V cristalizada, consiguiendo una conversión más rápida y más altos rendimientos. Según aclaran los autores, es apropiado emplear un exceso de acetato potásico; además, si se regula el contenido en agua, pueden separarse otras penicilinas diferentes de la penicilina V que estuviesen presentes⁴⁷³.

El 3 de abril de 1962, la empresa alemana *Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft (Meister Lucius & Brüning)* presentó al registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento para la obtención de una sal de penicilina V adecuada para la administración bucal”⁴⁷⁴. Los autores proponen un procedimiento para la obtención de una sal de penicilina V difícilmente soluble y adecuada para suspensiones acuosas administrables por vía oral: la sal de bencil-dehidro-abietil-amina de penicilina V⁴⁷⁵, que se distingue por una solubilidad particularmente baja, tanto en el agua como en el jugo gástrico, mientras que en jugo intestinal es mucho más soluble que las sales de penicilina V conocidas en este momento [1962]⁴⁷⁶.

El empleo de la sal de bencil-dehidro-abietil-amina de penicilina V representa un progreso en la terapia con penicilina administrada por vía oral; debido a su poca solubilidad en agua, pueden hacerse con ella suspensiones acuosas muy estables que son absorbidas perfectamente por el intestino, obteniéndose contenidos muy elevados de la sal en sangre, que se mantienen por mucho tiempo.

⁴⁷³ Los autores proponen unos ejemplos, nueve en total, para aclarar este procedimiento; nos ocupamos del primero de ellos: en un vaso se introducen 20 ml. de etanol que contiene un 4% de agua, se añadieron primeramente 3,5 g. de N,N'-dibencil-etilén-diamina-dipenicilina V que contenía 6,4% de agua y 1.185 U.I./mg. de penicilina; a continuación se adiciona una cantidad de 1,5 g. de acetato potásico, que corresponde a un exceso de acetato potásico del 120%. La mezcla se dejó reposar aproximadamente un minuto y, a continuación, se filtró por medio de un filtro de vidrio. El filtrado se usó para lavar el vaso y se vertió de nuevo sobre el filtro para conseguir trasladar cuantitativamente el precipitado del vaso al filtro. Luego se lavó con 5 ml. de etanol (que contenía un 4% de agua) y, después, con 10 ml. de acetona. El producto se secó al vacío. Los cristales secos de la sal potásica de penicilina V pesaron 2,61 g.; su pureza fue de 1.530 U.I./mg.; el rendimiento obtenido fue del 96%.

⁴⁷⁴ AHOEPM, patente 276.130; la memoria descriptiva consta de once hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras; está firmada en Madrid, a 3-IV-1962. Esta solicitud se corresponde a la presentada en Alemania el 6 de abril de 1961. La empresa tiene fijado su domicilio social en Frankfurt (M)-Hoechst (Republica Federal Alemana). La patente española fue concedida el 28-IX-1962 y publicada el 1-XII-1962.

⁴⁷⁵ Para el desarrollo del procedimiento destinado a la obtención de sales cristalinas poco solubles de penicilina V, y de otras penicilinas relativamente estables a los ácidos, como por ejemplo las sales de procaína de mercapto-metil-penicilinas, los autores remiten a la patente estadounidense 2.528.175; para la sal de dibencil-amina de fenoxi-metil-penicilina, a la patente austriaca 191.546 y para la sal de N,N'-bis-dehidro-abietil-etilén-diamina de fenoxi-penicilina, a la patente suiza 335.804.

⁴⁷⁶ En la memoria descriptiva se presentan, de manera comparada, los datos sobre solubilidad en agua a 24° C, sensibilidad al jugo gástrico y sensibilidad al jugo intestinal artificial a 37° C de: base de sal de penicilina V, N-bencil-beta-fenil-etil-amina, dibencil-etilén-diamina, dibencil-amina, di-dehidro-abietil-etilén-diamina, dehidro-abietil-amina y bencil-dehidro-abietil-amina. Se constata la menor solubilidad en agua y jugo gástrico, y la mayor solubilidad en jugo intestinal, de la base de la sal de penicilina V.

Esta sal de bencil-dehidro-abietil-amina de penicilina V puede ser lograda por procedimientos conocidos; es posible obtenerla en agua, por doble transformación partiendo de una sal de penicilina V fácilmente soluble y de una sal de la base; también pueden disolverse los dos componentes en un disolvente orgánico y separarse la sal sódica por evaporación o por precipitación con un producto no disolvente.

La sal de bencil-dehidro-abietil-amina de penicilina V forma finas agujas incoloras que se disuelven fácilmente en metanol y, menos fácilmente, en etanol e isopropanol; el cloruro de metilo disuelve con facilidad la sal. Una cantidad de 1 mg. corresponde a 807 U.I. Esta sal tiene un sabor ligeramente amargo; puede obtenerse un regusto dulzón si se precipita con agua la sal de penicilina en metanol, ácido de penicilina V y bencil-dehidro-abietil-amina en presencia de *ca.* 1% de sacarina de bencil-dehidro-abietil-amina; las restantes propiedades de la sal de penicilina V no son perceptiblemente alteradas por la sacarina.

El autor propone unos ejemplos de la aplicación de este procedimiento para la obtención de zumos y tabletas⁴⁷⁷.

2.2.5.d. Derivados con sulfatos

El 7 de marzo de 1953, la entidad británica *Glaxo Laboratories Limited* presentó ante el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, “Un procedimiento para la producción de penicilina”⁴⁷⁸; éste está relacionado con los medios mejorados para la fermentación de los microorganismos productores de penicilina⁴⁷⁹.

La adición de un precursor, al tiempo que origina una elevación en el rendimiento de la penicilina, produce ulteriores aumentos si se halla presente una adecuada fuente de azufre. Análogamente, la presencia de una fuente de azufre, en un medio que no contenga un precursor para la penicilina, es provechosa por si sola, pero la presencia de un precursor aumenta más el rendimiento.

Con anterioridad a este procedimiento, se obtuvieron rendimientos óptimos con adiciones de fenil-acetil-etanol-amina del orden de 0,1%; cantidades superiores a esta

⁴⁷⁷ Nos ocupamos del primero de ellos: se disuelven, con agitación, en 1,45 l. de metanol, 1.159 g. de base de bencil-hidro-abietil-amina (masa molar 375 g.) y se añaden a 8°-10° C, 142,8 g. de ácido de penicilina V (masa molar 350 g.); se dejan gotear en la solución, durante 2 horas, 240 ml. de agua destilada, agitando al mismo tiempo, con ello se separa la mayor parte de la sal de penicilina V en forma cristalizada. Durante 20 horas, se añaden 2,26 l. de agua, luego se filtra por aspiración, se lava con agua y se seca a temperatura ambiente en el vacío. La cantidad de sal de bencil-dehidro-abietil-amina del ácido de penicilina V es de 285,0 g., que representan el 96,3% de la cantidad calculada; el efecto comprobado fue de 842 U.I./mg. de penicilina V, mientras que el calculado fue de 807 U.I./mg. de penicilina V.

⁴⁷⁸ AHOEPM, patente 208.132; la memoria descriptiva consta de 23 hojas escritas a máquina, por una sola cara; queda firmada en Madrid, a 7-III-1953. Esta solicitud se corresponde con la presentada en Gran Bretaña el 10-III-1952, registrada bajo el número 6173/52. Como domicilio de la empresa figura Greenford, Middlesex (Inglaterra). La patente, concedida en la modalidad de invención, fue aprobada el 27-IV-1953 y publicada el 1-VI-1953.

⁴⁷⁹ Aclaran los autores que utilizan el termino ‘penicilina’ para referirse a una sustancia antibiótica, o mezcla de sustancias, producidas por la fermentación de organismos del género *Penicillium*, tales como *Penicillium notatum* y *Penicillium chrysogenum*. Ejemplos de los antibióticos que se incluyen dentro del término general de penicilina son los conocidos con los nombres de penicilina G, penicilina X y penicilina F.

cifra no suministraron mucha más penicilina⁴⁸⁰. Pero incluyendo también una fuente de azufre, se está en disposición de emplear niveles más altos de precursores de penicilina, y de obtener mayores rendimientos que los que pudieran lograrse empleando una cantidad cualquiera de precursor sin dicha adición.

La selección de una fuente conveniente de azufre ha sido objeto de cuidadosas investigaciones, solamente los tío-sulfatos parecen dar resultados satisfactorios frente a otros compuestos que contienen azufre, como cisteína, sulfatos, sulfitos y sus análogos, que no parecen adecuados, al menos en condiciones de cultivo con las que se pueden obtener altos rendimientos, esto es en condiciones de cultivo sumergido.

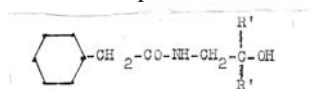
Mantienen los autores de esta memoria que, fermentando en condiciones de cultivo sumergido un organismo productor de penicilina, en un líquido de maceración de maíz con un tío-sulfato⁴⁸¹ y un precursor de penicilina⁴⁸², el microorganismo puede obtener más provecho del precursor y del azufre en su síntesis de la penicilina, con la producción resultante de más altos rendimientos de penicilina. En condiciones óptimas pueden lograrse rendimientos superiores a las 2.000 U.I./ml.

Para determinar el tío-sulfato que es adecuado a este procedimiento, los autores han realizado experimentos preliminares con 'frascos de agitación'; los resultados obtenidos les llevan a recomendar tío-sulfato sódico, tío-sulfato potásico, tío-sulfato amónico o tío-sulfato magnésico.

Los precursores de la penicilina han de ser usados en proporciones superiores al 0,1% y, preferiblemente, más del 0,2%; el límite superior viene determinado por el leve efecto tóxico de ciertos precursores sobre el microorganismo. Algunos precursores son rápidamente consumidos durante la fermentación, sin haber sido empleados necesariamente por el hongo para la síntesis de penicilina, por lo que es normal, en tales casos, la adición de nuevas cantidades del precursor conforme avanza el proceso fermentativo; pero esto no resultaría necesario empleando como precursor la fenil-acetil-etanol-amina⁴⁸³. Es conveniente utilizar cantidades de tío-sulfato en el medio, tales que correspondan a un contenido de azufre mayor de 0,01%, con preferencia *ca.* 0.02% de azufre como tío-sulfato.

Como ya quedó señalado, el límite superior de la adición del precursor y tío-sulfato queda determinado por las cantidades de estos componentes que el microorganismo puede tolerar; una adición excesiva de uno de los dos constituyentes origina una inhibición en el desarrollo. Pero la cantidad de cualquier constituyente que

⁴⁸⁰ *Glaxo Laboratories* Limited remite a las patentes británicas 586.930 y 613.492, donde se hace referencia al empleo de fenil-acetil-etanol-amina.



Fenil-acetil-etanol-amina

R' puede ser hidrógeno, metilo, etilo, éteres alquílicos que poseen poco átomos de carbono y alcoxi-derivados de los mismos.

⁴⁸¹ El tiosulfato empleado debe ser, por lo menos, parcialmente soluble en agua y su parte catiónica no ha de causar envenenamiento del microorganismo ni destrucción en la penicilina producida. Los autores remiten a la patente norteamericana número 2.437.918, probablemente propiedad del mismo grupo empresarial.

⁴⁸² El precursor de penicilina ha de ser uno de los siguientes compuestos: ácido fenil-acético, fenil-acetamida, fenil-acetil-etanol-amina o beta-fenil-etil-amina.

⁴⁸³ En la memoria se refieren a este precursor como el mencionado en la descripción de la patente británica número 613.432.

una cepa dada puede tolerar se incrementa mediante la aclimatación de dicha cepa a esas condiciones particulares. Los autores aportan los resultados de algunos trabajos experimentales con objeto de facilitar la comprensión del desarrollo de este procedimiento⁴⁸⁴.

2.2.5.e. Derivados de quinina

El 6 de diciembre de 1955 es una empresa española, el *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo, S.L.)*, quien presenta a registro una patente de introducción, por un período de diez años, para “Un procedimiento de obtención de penicilina G-quinina”⁴⁸⁵. Éste consiste en combinar penicilina G con quinina; con ello se consigue una nueva sal de penicilina que tiene un grado de insolubilidad intermedio entre el de la penicilina procaína y la penicilina benzatina, a la par que la asociación con la quinina le confiere la actividad antibacteriana que ésta posee⁴⁸⁶. Los autores reconocen que el procedimiento había sido ya empleado, con buenos resultados, fuera de nuestras fronteras, pero aún no había sido divulgado, ni practicado, ni puesto en ejecución en España, por lo solicitan una patente de introducción.

El proceso consiste en combinar, en una doble descomposición, sales de penicilina G y sales de quinina, disueltas en un medio acuoso y en concentraciones tales que, al juntarse las soluciones, se exceda el producto de solubilidad de la penicilina-quinina en el medio acuoso, a la temperatura en que desea separarse el precipitado de las aguas madre. En los trabajos experimentales que este laboratorio ha realizado, tanto las sales de penicilina como las de quinina han sido muy variadas; entre las sales de quinina empleadas figuran las de sulfato, formiato y clorhidrato; como sales de penicilina se han usado diversas sales solubles, tanto alcalinas como orgánicas solubles, tal la sal de N-etil-piperidina.

Entre los muchos ensayos realizados dio un resultado particularmente interesante el realizado con clorhidrato de quinina, cuya solubilidad en el agua y en soluciones acuosas de algunas sustancias orgánicas (por ejemplo cetona) es muy superior al de otras sales quinínicas y su pH de solución es el óptimo para realizar la reacción de la penicilina sin inactivarla, lo que le convierten en particularmente apto par la obtención de la nueva penicilina-quinina⁴⁸⁷.

⁴⁸⁴ En la memoria se presentan algunos experimentos comparativos entre el efecto del tiosulfato sódico en proporción 0,08%, con proporciones variables de fenil-etil-amina y fenil-etil-acetamida. Para estos experimentos se usó la cepa PM3 de *Penicillium chrysogenum*; se operó en un medio básico, cuya composición era la siguiente: lactosa (3,5%), sólidos (3,5%), KH_2PO_4 (0,4%), creta (1,0%), aceite de maíz (0,16 ml./frasco), adicionados separadamente; el tiosulfato sódico y la fenil-etil-amina o fenil-acetamida se adicionan según se vaya requiriendo. Los frascos de ensayo fueron agitados en un agitador de 210 revoluciones por minuto; a continuación fueron analizados microbiológicamente. Los resultados señalan los diferentes límites de la adición de tiosulfato.

⁴⁸⁵ AHOEPM, patente 225.437; la memoria descriptiva consta de cinco hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara, queda fechada en Madrid, a 6 de diciembre de 1955. La empresa, de nacionalidad española, figura con domicilio en Madrid, calle Alcalá nº 95. La patente fue concedida el 14-I-1956 y hecha pública el 16-II-1956.

⁴⁸⁶ La quinina, además de sus funciones antiinflamatorias y de exaltación de las defensas orgánicas contra las infecciones, tiene una acción antibacteriana específica en el caso particular de algunas infecciones como la neumonía.

⁴⁸⁷ Para describir adecuadamente ese procedimiento, los autores proponen un ejemplo de realización práctica: una cantidad de 0,01 moles de clorhidrato de quinina se disuelve en 30 cm³ de una

Un día después, el 7 de diciembre de 1955, este mismo *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)*, presenta a registro “Un procedimiento de obtención de sales poco solubles de penicilina V-quinina”⁴⁸⁸. Los autores parten de sus trabajos previos sobre la combinación de la penicilina con la quinina para obtener la sal poco soluble de un nuevo producto, la penicilina G-quinina, en la que se suman y se refuerzan las actividades antibióticas y antibacterianas de aquella y ésta, y se consiguen útiles efectos que la poca solubilidad de la sal determina en punto a su conservación en los niveles necesarios en sangre (AHOEPM, patente 225.437).

Los autores mantienen que estos favorables efectos de las sales poco solubles de penicilina-quinina pueden mejorarse si se parte de penicilina V, extraordinariamente estable y la única resistente a los ácidos, lo que la hace muy eficaz para el empleo parenteral, por su acción prolongada, y también para su aplicación en jarabes y comprimidos para uso oral e incluso en forma de supositorios para el tratamiento de procesos respiratorios agudos, en forma simple o asociada con otros medicamentos.

El procedimiento de obtención de penicilina V-quinina se fundamenta en una reacción química de doble descomposición. Los autores han comprobado, en su trabajo experimental, que al mezclar soluciones acuosas de penicilina V, en forma de sal soluble en agua, con soluciones acuosas de sales de quinina, aún en concentraciones relativamente bajas, precipita la sal de penicilina V de quinina, pues es muy poco soluble en agua.

El proceso de obtención es muy cómodo; a diferencia de lo que ocurre con la obtención de sales de penicilina G-quinina, la sal que se obtiene lo hace en estado cristalino, sin mostrar tendencia a precipitar en estados amorfos, que de ordinario son más impuros, difíciles de manejar y que secan con lentitud⁴⁸⁹.

solución acuosa de metil-acetona al 6,6%, a 60° C, en un vaso de precipitado de capacidad 500 cm³, manteniendo la temperatura durante la disolución por baño María y favoreciendo la disolución por medio de agitación mecánica. En un vaso de precipitado de 25-50 cm³ se disuelven, a temperatura ambiente, 0,01 moles de penicilina G sódica en 12-20 cm³ de agua destilada. Las dos soluciones preparadas han de tener transparencia perfecta, en caso contrario se han de filtrar a las temperaturas de régimen. Sin sacar la solución del clorhidrato de quinina del baño caliente, pero cesando el suministro de calor al baño y continuando la agitación, se le añade la solución de penicilina. Según se va realizando esta adición, se observa la formación de un precipitado nebuloso que se predisuelve y que al final persiste, dando un aspecto lechoso, de emulsión tenue, al líquido de reacción. Cuando se ha terminado la adición se lava el vaso menor con 10-20 cm³ de agua que se añaden sobre el vaso de reacción; también cuando se ha terminado la adición se suspende la agitación. Se ha de retirar el baño templado y se lleva el vaso a un baño de agua fría corriente; finalmente puede enfriarse en baño de hielo hasta 10°-12° C; agítese a esta temperatura con varilla de vidrio y fíltrese rápidamente. El producto sólido que se ha separado por filtración y desecación ulterior al vacío es penicilina G-quinina de un grado de pureza alto.

⁴⁸⁸ AHOEPM, patente 225.454; la memoria descriptiva consta de cuatro hojas mecanografiadas por una sola de sus caras, está firmada en Madrid a 7 de diciembre de 1955. La empresa figura como domiciliada en Madrid, en el número 95 de la calle Alcalá. La patente fue concedida el 16-I-1956 y publicada el 16-II-1956.

⁴⁸⁹ Los autores exponen un ejemplo aclaratorio de este proceso: en un gran vaso de precipitado se disuelven 40 g. de clorhidrato de quinina en agua, a una temperatura de 54°-56° C, agitando levemente hasta su disolución final. La solución se filtra; si tal operación hace descender la temperatura, ha de evitarse tal hecho, usando un artificio de filtración en caliente que lleve de nuevo el líquido a 54°-56° C. En un recipiente aparte se disuelven 39 g. de penicilina V potásica en 300 cm³ de agua; esta segunda solución se gotea sobre la primera, con agitación. Cuando termine la adición, se enfría en un vaso reactor

2.2.5.f. Derivados de difenil-piperizina

Con fecha de 3 de febrero de 1956 *Les Laboratoires Français de Chimiotherapie*, una entidad francesa, presenta “Un procedimiento de preparación de la sal de penicilina de la 2,5-difenil piperazina”⁴⁹⁰, para el que se solicita patente de protección por veinte años.

De acuerdo con el discurso de los autores, la penicilina forma con la 2,5-difenil-piperazina una sal poco soluble en agua, esto permite mantener en sangre una concentración eficaz de penicilina durante un período prolongado, hecho que tiene importancia en el empleo de los compuestos de penicilina. Los autores comparan la solubilidad de la nueva sal de penicilina con otras formas ‘retardadas’ de este antibiótico habituales en la práctica médica del momento [1956]⁴⁹¹. Una de las ventajas que se atribuye al nuevo producto reside en la ausencia de grupo sensibilizador en su molécula; lo cual representa un avance sobre la penicilina-procaína, que puede provocar accidentes graves en el organismo debido a una sensibilización de éste hacia el grupo para-amino de la molécula de procaína⁴⁹².

La nueva sal es preparada, según se relata en la memoria, en medio acuoso, haciendo reaccionar una solución, en agua o un solvente orgánico, de una sal de 2,5-difenil-piperazina⁴⁹³ sobre una solución acuosa de una sal de penicilina⁴⁹⁴. La reacción de doble descomposición en agua se lleva a cabo, siendo aislada la sal por aspiración o centrifugación, lavado con agua y secado; estas operaciones deben ser efectuadas en condiciones estériles para poder obtener un producto utilizable en terapéutica. La 2,5-difenil-piperazina fija dos moléculas de penicilina y, por lo tanto, presenta una actividad muy elevada que permite evitar la administración, siempre molesta, de gran cantidad de producto.

La nueva sal de 2,5-difenil-piperazina de la penicilina es administrada por vía parenteral, en forma de suspensión, en un agente conveniente como lo es el agua destilada, una solución salina normal, propilen-glicol al 20% u otros diluyentes acuosos habitualmente utilizados. Se puede emplear también un aceite, tal como el aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón u otros triglicéridos

en baño de agua corriente y, finalmente, en baño de agua-hielo hasta 15° C. Se filtra por succión y el sólido que se ha obtenido se seca en una estufa de vacío a 45°-50° C. Este sólido analizado demuestra ser penicilina V quinina.

⁴⁹⁰ AHOEPM, patente 226.495; la memoria consta de 11 hojas, mecanografiadas, escritas por una sola de sus caras y numeradas; queda firmada el 3 de febrero de 1956; como dirección de la empresa figura 89 rue de Cherche-Midi (París). La patente española fue concedida el 24-II-1956 y hecha pública el 1-IV-1956.

⁴⁹¹ Éstos son los datos aportados en el expediente: sales de penicilina y procaína, solubilidad en agua: 6,4 g./l., 4,5 g./l.; sales de penicilina y quinina, solubilidad en agua: 2,7 g./l., 0,35 g./l.

⁴⁹² El autor remite a Claude ALBAHERY. *Maladies medicamenteuses*. Paris: Masson, 1953 (pág. 121).

⁴⁹³ La 2,5-difenil-piperazina es preparada por reducción de la 2,5 difenil-dihidro-piperazina, según el método descrito por GABRIEL-S. “Wandlungen der aminoketone”. *Chemische Berichte*, 41: 1127-1156. Weinheim, 1908. Los autores advierten que no debe confundirse la 2,5-difenil-piperazina (punto de fusión 195°-196° C), con la N,N'-difenil-piperazina, que funde a 164°-165° C.

⁴⁹⁴ La sal de penicilina preferentemente usada es una sal de penicilina G, aunque podrían emplearse otras penicilinas. También de manera preferente se utiliza el acetato de 2,5-difenil-piperazina y el penicilinato de trietil-amina.

asimilables. En todos los casos será conveniente añadir a la preparación un agente estabilizador, un agente tixotrópico, un modificador de la viscosidad y un humectante, de forma que confieran a la preparación las cualidades requeridas para la inyección por medio de una jeringuilla hipodérmica. Los cristales pueden ser molidos previamente.

La memoria técnica de esta patente se completa con tres bloques de ejemplos destinados a la preparación de 2,5-difenil-piperazina⁴⁹⁵.

2.2.5.g. Derivados de isoquinolinas

El 25 de febrero de 1956 la empresa alemana *Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para registrar, por veinte años, un nuevo “Procedimiento para la obtención de sales de penicilina”⁴⁹⁶.

Los autores parten del hecho de que la 1,2,3,4-tetra-hidro-isoquinolina y sus derivados C-sustituídos por uno o varios restos de hidrocarburos forman sales bien cristalizadas de la penicilina. Estas sales de penicilina se obtienen por la reacción de penicilina -o sus sales- con las tetra-hidro-isoquinolinas -o sus sales- en agentes disolventes acuosos u orgánicos⁴⁹⁷.

La solubilidad de las sales de penicilina depende de la sustitución del sistema de anillo de la tetra-hidro-isoquinolina. La sal de penicilina G de la tetra-hidro-isoquinolina tiene una solubilidad en agua de un 2%; por sustitución con un resto bencílico en la posición 1, se consigue una reducción de la solubilidad de la correspondiente sal de penicilina a un 0,3%; la sal 1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidro-isoquinolina-penicilina G tiene una solubilidad de 0,2%. Estas dos sales presentan, debido a su pequeña solubilidad después de la inyección, un efecto retardador muy favorable; además, como no irritan y tienen poca toxicidad, son adecuadas para la fabricación de preparados inyectables de utilización clínica⁴⁹⁸.

⁴⁹⁵ Nos ocupamos, a modo de ejemplo, del primero de ellos: Preparación de 2,5-difenil-piperazina a partir de 2,5-difenil-dihidro-pirazina: en 450 cm³ de ácido fórmico se disuelven 50 cm³ de 2,5-difenil-dihidro-piperazina; a esta solución se agregan 5 g. de paladio-carbono (con un 2% de paladio) e hidrógeno durante seis horas a la temperatura ambiente. Toda la mezcla se filtra para eliminar el carbón-paladio; al filtrado se le añade, poco a poco, en un tiempo de dos horas y con agitación, 1.800 cm³ de amoníaco enfriando en baño de hielo, de manera que no se rebase la temperatura de 20° C. Se aspira, se lava con 300 cm³ de agua y se seca al vacío para obtener 44 gramos (87%) de 2,5-difenil-piperazina. El producto es purificado, por disolución, en diez volúmenes de etanol, adición de dos volúmenes de ácido clorhídrico concentrado, enfriamiento, separación del clorhidrato, disolución de este último en 35 volúmenes de agua y precipitación por dos volúmenes de amoníaco. El producto se presenta en forma de cristales incoloros poco solubles en agua, solubles en alcohol en caliente, insolubles en éter, con un punto de fusión de 195°-196° C. Análisis: C₁₆H₁₈N₂= 238,3; valores calculados: C 80,6%, H 7,6% y N 11,7%; valores hallados: C 80,6%, H 7,7% y N 11,7%.

⁴⁹⁶ AHOEPM, patente 226.921; la memoria descriptiva consta de cinco hojas, escritas por una sola cara, fechadas en Madrid, a 25 de febrero de 1956. El expediente se corresponde con el aprobado por la Administración alemana el 1 de abril de 1955, bajo el número F-17.140-I-Vc/12p. La empresa tiene fijado su domicilio en Leverkusen-Bayerwerk (Alemania). La patente española le fue concedida el 15-III-1956 y publicada el 1-V-1956.

⁴⁹⁷ Como penicilina se puede utilizar penicilina G o cualquier otra penicilina; son sustituyentes adecuados de la tetra-hidro-isoquinolina, los grupos alquílicos, cicloalquílicos, arílicos y aralquílicos, estos sustituyentes se pueden encontrar en uno o varios átomos de carbono del anillo isoquinólico.

⁴⁹⁸ Los autores ilustran este procedimiento con ocho ejemplos; recogemos el primero de ellos: en 10 cm³ de agua se disuelven 1,68 g. de hidrócloruro de 1,2,3,4-tetra-hidro-isoquinolina y se agregan, gota

2.2.5.h. Derivados fenil- y fenoxi-

El 23 de marzo de 1960 se presentó en el registro español de patentes un expediente para proteger un “Procedimiento para la fabricación de penicilinas” a nombre de la empresa austriaca *Biochemie Gesellschaft mit Beschränkter Haftung*⁴⁹⁹; como responsables del procedimiento figuran los austriacos Hans Margreiter, Richard Brunner y Ernst Brandl.

El procedimiento registrado se refiere a la fabricación de penicilinas de fórmula general $C_8H_{10}O_3NS-NH-Z_1-R_1-(X-R_2)_n$, en la cual Z_1 alude a un grupo CO- o SO₂, R_1 a un resto alifático bivalente que puede estar sustituido⁵⁰⁰, X representa un enlace, oxígeno o azufre, R_2 un radical orgánico, preferentemente alifático, aril-alifático o heterocíclico, que eventualmente puede estar sustituido, y n es un número entero, 1 ó 2.

El interés de los autores se centra en conseguir un procedimiento de fermentación en el que, con la adición de un adecuado compuesto precursor, no solamente puedan obtenerse, con un rendimiento mejorado, las penicilinas ya conocidas⁵⁰¹ sino otras que no podían lograrse cuando se empleaba *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* o sus mutantes, en presencia de los compuestos precursores usuales.

En la utilidad de los compuestos precursores empleados en este procedimiento sobresalen los ácidos acéticos alfa-sustituidos, por ejemplo ácidos fenoxi-acéticos y, especialmente, aquellos ácidos acéticos cuyo átomo de carbono-alfa tiene carácter terciario, porque las penicilinas con restos de tales ácidos acéticos (fenoxi-acéticos) eran difícilmente accesibles -o inaccesibles- por los métodos usuales de fermentación⁵⁰². También son fácilmente accesibles por vía fermentativa los ácidos que, en el anillo aromático, llevan 2 ó 3 sustituyentes⁵⁰³. Y los halogenuros de los ácidos oxi-acéticos y ácidos alifáticos⁵⁰⁴.

a gota, a una solución acuosa de 4,35 g. de trietil-amino-penicilina G. Después de un corto tiempo se efectúa la cristalización; los cristales se aíslan en la forma usual, tienen una potencia de 1.270 U.I./mg. y su punto de fusión se establece en 96° C.

⁴⁹⁹ AHOEPM, patente 262.685; la memoria descriptiva consta de 36 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara, queda firmada, de modo apenas legible, en Madrid, a 23-XI-1960. El expediente se construye sobre tres solicitudes presentadas ante la Administración austriaca: A-8517/59, del día 24-XI-1959; A-1603/60, del día 1-III-1960 y A-7071/60, del día 17-IX-1960. Esta sociedad austriaca tuvo su sede en Kundl (Tirol). La patente española fue concedida el 23-XI-1960 y publicada el 1-III-1961.

⁵⁰⁰ R_1 puede ser un radical recto o ramificado, mostrar en la cadena recta y/o en la cadena lateral uno o varios enlaces dobles; también puede llevar uno o varios sustituyentes, ejemplos de los cuales son los grupos alquilo, alquenilo, amino-alquilo o N-acil-amino-alquilo; incluso, dado el caso, grupos sustituidos amino o hidroxilo, y eventualmente restos aromáticos sustituidos, como restos de fenilo y aralquilo.

⁵⁰¹ Expresamente se mencionan: fenoxi-metil-penicilina, p-cresoxi-metil-penicilina, fenil-mercapto-metil-penicilina, bencil-penicilina y N-butoxi-metil-penicilina.

⁵⁰² Son ejemplos de tales ácidos acéticos sustituidos en el átomo de carbono-alfa: ácido (alfa-metil)-fenoxi-acético, (alfa-fenil)-fenoxi-acético, ácido-alfa-fenoxi-estearínico, N-acetil-triptófano y ácido amigdalico.

⁵⁰³ Ejemplos de tales compuestos son el ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético, ácido 3,4-dicloro-fenoxi-acético, ácido 3-cloro-4-metil-fenoxi-acético, ácido 4-cloro-3-metil-fenoxi-acético, ácido 3-metil-6-cloro-

Los compuestos precursores que se derivan de ácidos fenil- y fenoxi- O-sustituídos, como ácido acético 2-cloro-fenoxi, ácido acético 2-cres-oxi, ácido acético 2-oxi-fenil, ácido acético 2-oxi-fenoxi o ácido acético 2-metoxi-fenoxi, no se habían introducido, en estos años de comienzos de la década de 1960, por vía fermentativa. Los compuestos precursores derivados de ácidos m-sustituídos fenil-acéticos y fenoxi-acéticos, como ácido 3-oxi-fenoxi-acético y ácido 3-nitro-fenoxi-acético, se habían interpuesto con reducido rendimiento.

Los autores proponen la utilización de precursores del tipo del ácido 4-etil-fenoxi-acético, 4-propil-fenoxi-acético, 4-terciario-butil-fenoxi-acético, ácido-4-n-hexil-fenoxi-acético, 4-aceto-fenoxi-acético, 4-acetil-amino-fenoxi-acético, 4-pentil-ceto-fenoxi-acético, 4-oxi-fenoxi-acético, 4-etoxi-fenoxi-acético, 4-formil-fenoxi-acético, 4-ciano-fenoxi-acético o sulfoácido-fenoxi-acético, utilizando como compuestos precursores halogenuros ácidos de estos ácidos, de fórmula general $(R_2-X_n)-R_1-Z_2$, donde R_1 alude a un resto alifático bivalente que puede estar sustituido, R_2 un radical orgánico, preferentemente alifático, aril-alifático o heterocíclico, que eventualmente puede estar sustituido, n es un número entero, 1 ó 2, X representa un enlace, oxígeno o azufre y Z_2 simboliza un grupo $-COOH$ ó $-SO_3H$.

Los compuestos precursores pueden añadirse disueltos en un disolvente orgánico atóxico; de esta manera se consigue mantener especialmente baja la cantidad de los productos secundarios producidos en la fermentación⁵⁰⁵; la proporción más adecuada de la mezcla del compuesto precursor respecto al disolvente orgánico está comprendida entre los límites de 1:1 hasta 1:20.

La adición del precursor ha de efectuarse durante una parte considerable del período de fermentación. Para obtener rendimientos elevados, conviene comenzar con la adición del precursor sólo después de un breve tiempo de iniciación de la fermentación; y continuar la fermentación después de la última adición de precursor todavía unas 3 a 5 horas. La adición del precursor puede efectuarse, en este procedimiento, de modo intermitente, mediante pequeñas participaciones o, preferentemente, de modo continuo. Si en la fermentación, por exceso de halogenuro ácido, ocurriese un descenso del valor del pH, lo que tendría efectos perjudiciales para el curso del proceso fermentativo, se debe actuar sobre este descenso de pH por adición de sustancias amortiguadoras a la solución nutritiva o mediante productos de reacción alcalina⁵⁰⁶. Conviene regular, durante la adición del precursor en la solución de fermentación, el valor del pH dentro

fenoxi-acético, ácido 3,4-dimetil-fenoxi-acético, ácido 3,5-dimetil-fenoxi-acético, ácido 2,4-dinitro-fenoxi-acético y ácidos fenoxi-acéticos tri-sustituídos, como el ácido 4-cloro-3,5-dimetil-fenoxi-acético.

⁵⁰⁴ En la memoria descriptiva se citan los siguientes: ácido epoxi-acético, ácido dicloro-acético, ácido caprónico, ácido caprílico, ácido laurínico, ácido adipínico, ácidos mercapto-acéticos, ácido 2-metil-4-oxi-fenil-mercapto-acético, ácido 3-metil-4-oxi-fenil-mercapto-acético, ácido alfa-oxifenil-mercapto-fenil-acético, ácido 4-tolil-mercapto-acético, ácido piridoxi-acético, ácido beta-naftoxi-acético, ácido 4-oxifenil-alfa-tiopropiónico, fenil-serina, ácido bencil-sufónico, ácido 4-oxi-cinámico, ácido 2,3-o-homo-veratrinico y ácido 3,4-o-homo-veratrinico.

⁵⁰⁵ Entre los disolventes orgánicos empleados se incluyen los ésteres, especialmente etil-acetato o amilo-acetato, pero también cloroformo y metil-iso-butil-acetona.

⁵⁰⁶ Estas sustancias amortiguadoras pueden estar previamente presentes en la solución o agregarse simultáneamente con el precursor, pero en lugar distinto al del suministro del precursor. La adición de sustancias neutralizadoras se efectúa, por lo general, en dependencia del suministro del precursor. Los autores indican que son adecuadas sustancias amortiguadoras como el bicarbonato sódico o mezclas de fosfatos, aunque también se han de considerar como materiales neutralizadores las soluciones de álcali, en especial la de hidróxido sódico.

de los límites fisiológicos. Durante la fermentación puede llegarse, también, a una reducción del compuesto precursor excedente, lo que representa otra ventaja en la subsiguiente extracción.

Si se utilizan como precursores halogenuros que contienen un carbón asimétrico, pueden introducirse en diferentes forma isómeras, generalmente se emplea el racemato para la acilación, en cuyo caso se obtiene la correspondiente penicilina DL. Los halogenuros ácidos utilizados como precursores producen rendimientos favorables de penicilina; se caracterizan, además, por una eficacia selectiva contra bacterias, y no se ha observado ninguna limitación del crecimiento del hongo, en las concentraciones usadas habitualmente.

Existen diferencias en la idoneidad de cepas de penicilina para la utilización de este procedimiento; resultan especialmente convenientes *Penicillium chrysogenum* WIS q 176, *Penicillium chrysogenum* 51-20 y sus mutantes.

Los autores se muestran especialmente interesados en la obtención, de manera sencilla y económica, de mezclas de penicilina, de las que, al menos una de ellas, sea estable al ácido⁵⁰⁷; estas mezclas han tenido importancia gracias a su efecto sinérgico. La obtención de estas mezclas de penicilinas es posible si, por lo menos una parte de la fermentación, se realiza en presencia de dos compuestos precursores diferentes, de los que al menos uno de ellos sea un halogenuro de ácido, de fórmula general $(R_2-X_n)-R_1-Z_2$, descrita líneas arriba. Existen por lo tanto, simultáneamente en un mismo recipiente de fermentación, compuestos precursores para dos penicilinas⁵⁰⁸. Realizada así la fermentación se obtiene un rendimiento total muy alto de penicilina, comparada con el caso en que se opere con un solo precursor, bien sea del modo habitual, esto es en forma de un alcohol o de un ácido, como fenoxi-etanol o ácido fenoxi-acético, o bien en forma de un derivado reactivo de un ácido, como cloruro alfa-metil-fenoxi-acético.

Los autores, para ilustrar su procedimiento, proponen varios ejemplos; para la ejecución de las fermentaciones descritas se utilizó, en todos los casos, una solución nutritiva de cepa de la siguiente composición: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01%), H_3PO_4 (0,4%), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,025%), $CaCl_2$ (0,01%), lactosa (4,0%) y glucosa (1,0%); el valor pH de la solución nutritiva se fijó, con NOH, a 6,0. Antes de la inoculación se agregó a la solución nutritiva, estéril, un 1% de una suspensión de $CaCO_3$ al 25%⁵⁰⁹.

⁵⁰⁷ Remiten a las definidas en la patente austriaca 178.692.

⁵⁰⁸ En estos modelos de fermentación, en que se agregan simultáneamente dos compuestos precursores, pueden ser éstos dos derivados reactivos de diferentes ácidos, como de ácido fenoxi-acético y de ácido alfa-metil-fenoxi-acético; por ejemplo, cloruro de ácido fenoxi-acético y cloruro de ácido alfa-metil-fenoxi-acético. También puede procederse añadiendo previamente un ácido, por ejemplo ácido fenoxi-acético, en cantidades en defecto, es decir que no se aprovecha la total capacidad del hongo; entonces, durante el curso de la fermentación, puede añadirse continuamente -o a intervalos- un derivado reactivo diferente del ácido añadido; por ejemplo, en el supuesto indicado, como antes se ha adicionado ácido fenoxi-acético, se puede adicionar ahora cloruro del ácido alfa-metil-fenoxi-acético.

⁵⁰⁹ De la más de una veintena de ejemplos que presenta el expediente comentamos el primero de ellos: se emplean 90 ml. de solución nutritiva de cepa, 10 ml. de autolisado de levadura de cerveza (con 20 g. de nitrógeno/litro), 0,1% en volumen de cloruro de ácido alfa-fenoxi-propiónico a partir de la 72ª hora, añadido a intervalos de 12 horas; 1% de material de inoculación de esporas de la cepa de *Penicillium chrysogenum* 351. Como recipiente de fermentación se utilizó un matraz Erlenmeyer de 2 litros sobre máquina agitadora con 240 revoluciones por minuto; el tiempo de fermentación se fijó en 168 horas y la temperatura de fermentación en 24° C. El contenido de penicilina alcanzado, mediante prueba de placa contra *Staphylococcus aureus* SG 511, se estableció en 3.200 U.I./ml.

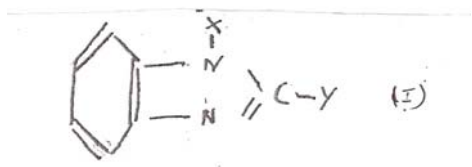
2.2.5.i. Penicilinas con acción antihistamínica

Los mecanismos de acción agrupados en esta serie pretenden evitar el exceso de histamina que sufrían muchos pacientes al ser inyectados con penicilina, con el consecuente problema de poder padecer un choque anafiláctico. Como recuerdan los propios redactores de las memorias descriptivas que estudiamos, el número de este tipo de accidentes aumentó paralelamente al uso de los antibióticos.

Por ello se iniciaron desarrollos destinados a la obtención, por síntesis, de derivados de la penicilina en los cuales el riesgo apuntado disminuyera, e incluso se anulara, pero conservando el fármaco su actividad antibiótica. Se consiguieron algunos resultados aceptables uniendo la molécula de penicilina con compuestos antihistamínicos sintéticos, que protegen contra el choque anafiláctico originado por liberación de histamina.

El 19 de agosto de 1953 la empresa alemana *Chemie Grünenthal* Gesellschaft m.b.H. presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para que le fuera reconocida la protección, por veinte años, para una invención relativa a “Un procedimiento para la obtención de un compuesto de penicilina-antihistamina”⁵¹⁰.

El empleo de la penicilina produce, con alguna frecuencia, procesos de alergia en las personas tratadas; ocurre lo mismo cuando se emplean compuestos salinos de penicilina con bases orgánicas, como podía ser la novocaína. Los autores creen que pueden evitarse estos efectos negativos si se hace reaccionar la penicilina, especialmente en forma de sus sales alcalinas, con compuestos de bencimidazol; tiene particular importancia la combinación con 1-p-cloro-bencil-2-N-pirrolidil-metil-bencimidazol.



Bencimidazol, fórmula general.

X. Reactivo aralquílico.

Y. Resto alifático que contiene, por lo menos, un grupo amino de naturaleza secundaria o terciaria.

La técnica operativa para la producción de estos compuestos consiste en hacer reaccionar la penicilina, en forma de sales metálicas, en especial en forma de sales alcalinas, en solución acuosa con las bases orgánicas, convenientemente en forma de sus sales, separándose los compuestos deseados como precipitados difícilmente solubles. El procedimiento de obtención puede ser ejecutado empleando las distintas clases de penicilina, por ejemplo la penicilina amorfa o la penicilina cristalizada. Los compuestos

En el matraz de comparación se trabajó sin adición de cloruro de ácido alfa-propiónico; después de terminada la fermentación, una parte alícuota se separó del micelio; el líquido de cultivo obtenido se aciló, en presencia de bicarbonato sódico, con exceso de cloruro de ácido fenoxi-propiónico, en lo que por el mismo método de prueba solamente se determinaron 2.900 U.I./ml. de penicilina.

⁵¹⁰ AHOEPM, patente 210.907; la memoria descriptiva consta de tres hojas numeradas y mecanografiadas por una sola cara. La empresa figura como domiciliada en Stolbreg/Rheinland (Alemania). La patente española fue concedida el 11-XI-1954 y publicada el 16-XII-1954.

que se obtienen pueden emplearse en forma de suspensiones, preferentemente en soluciones isotónicas⁵¹¹.

El 1 de septiembre de 1962 fue una empresa española, *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)* quien solicitó la protección para una de sus invenciones, un “Procedimiento de obtención de sales de penicilina con eficacia antihistamínica y antiserotonínica”⁵¹².

Parten los autores de la importancia de la liberación de serotonina en las manifestaciones alérgicas humanas y, por ello, trabajan sobre un compuesto asociado a la penicilina que tenga no sólo acción antihistamínica, sino también efecto serotoninico. Los estudios sobre este compuesto y su sal antibiótica han sido realizados en ratones sensibilizados al suero de caballo, comparando con los correspondientes testigos no protegidos⁵¹³; los resultados obtenidos revelan que el número de animales muertos por choque anafiláctico es sensiblemente igual en el grupo de control que en el tratado con penicilina-cálcica, lo que demuestra que este compuesto no tiene acción protectora; los grupos tratados con penicilina protectora presentan una mortalidad mucho menor y en proporción lógica con la dosis administrada de la nueva sal.

En las pruebas clínicas realizadas en voluntarios, a los que les fue administrado el nuevo producto en dosis de 200.00 U.I. por vía oral y 30.000 U.I. por vía parenteral intramuscular, se comprobó que la nueva sal presenta, simultáneamente, efecto antibiótico, antialérgico y psicosedante o tranquilizador⁵¹⁴.

Para la obtención de esta nueva sal se utilizan como materia prima bien la penicilina V-potásica, bien la penicilina G-sódica y el clorhidrato de cipro-heptadina (‘Periactin’ comercializado por *Merck Sharp & Dohne International*), haciendo

⁵¹¹ Los autores proponen un par de ejemplos aclaratorios de su procedimiento; éste es el primero de ellos: una solución acuosa de una sal de penicilina G, enfriada a 1°-5° C, se mezcla con una cantidad equivalente de una solución acuosa, también enfriada, de clorhidrato de 1-p-cloro-bencil-2-pirridilil-metil-bencimidazol. La emulsión obtenida cristaliza, dejándola reposar durante un tiempo prolongado en un frigorífico. El precipitado blanco que se forma se tritura con agua fría, se filtra y lava con agua; luego se seca la sal en un desecador de vacío a una temperatura de 147°-148,7° C; hay que tener en cuenta que se produce efervescencia y espuma, la velocidad de calentamiento ha de ser 5° C/minuto y la temperatura de inmersión 105° C.

⁵¹² AHOEPM, patente 280.469; la memoria descriptiva consta de doce hojas debidamente foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; está firmada en Madrid, a 26 de agosto de 1962. La empresa figura como domiciliada en Madrid, en el número 95 de la calle de Alcalá. La patente le fue concedida el 24-IX-1962 y hecha publica el 16-I-1963.

⁵¹³ Los estudios se realizaron con penicilina V-cálcica; se operó con lotes de 10 ratones homogéneos en peso y procedencia que se sensibilizaron previamente con suero de caballo; a las 4 semanas de la sensibilización se les provocó el choque anafiláctico para desencadenar en el animal sensibilidad a la liberación de histamina, serotonina y sustancias de lenta reacción, que serán los causantes del choque: un grupo control (grupo 0) se trató solamente con suero de caballo, que desencadena el choque; otro grupo (grupo 1) fue inyectado con suero de caballo y sal de penicilina sin acción protectora (penicilina V), otro grupo (grupo 2) fue tratado con el compuesto penicilínico protector puro para cuyo procedimiento de obtención el inventor solicita la patente; otros tres grupos se trataron con mezclas variables de este compuesto penicilínico protector y la sal de penicilina cálcica sin efecto protector.

⁵¹⁴ La memoria aporta una tabla de datos en la que se reflejan los resultados obtenidos tras la aplicación de estas dosis y la presencia de penicilina, medida en U.I./ml. al cabo de 30 minutos, y una, dos, tres y cinco horas, tanto en administración oral como parenteral. Las pruebas se realizaron tanto con penicilina V como con penicilina G.

reaccionar la penicilina ácida, en disolvente adecuado, con cipro-heptadina base disuelta en medio miscible con el disolvente de la penicilina⁵¹⁵.

En definitiva se trata de un procedimiento de obtención de sales de penicilina con eficacia antihistamínica y antiserotonínica, caracterizado porque se ponen en íntimo contacto una penicilina en su forma de ácido libre con cipro-heptadina en forma de base libre.

Este mismo 1 de septiembre de 1962, y bajo planteamientos esencialmente similares a los anteriormente expuestos, el *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)* presentó ante el registro de patentes un "Procedimiento de obtención de sales de penicilina con eficacia antihistamínica y antiserotonínica"⁵¹⁶; se trata de una nueva sal en la que se utiliza como materia prima bien la penicilina V-potásica bien la penicilina G-sódica y el clorhidrato de cipro-heptadina (marca comercial 'Periactin' de *Merck Sharp & Dohme International*) haciendo reaccionar la sal de penicilina disuelta en medio acuoso, para que se encuentre disociada con la solución de clorhidrato de cipro-heptadina, también en medio acuoso.

En primer lugar se prepara una disolución de la sal de penicilina V (generalmente penicilina V-potásica cristalizada) en disolvente acuoso, la mayoría de las pruebas fueron realizadas en solución de metil-etil-cetona en agua, con resultados satisfactorios, en concentraciones que varían del 1-10% (V/V), aunque también se realizaron pruebas en las que el disolvente era agua destilada, agua saturada con éter y mezcla de agua y acetona. A continuación se prepara una segunda solución, disolviendo

⁵¹⁵ Los autores aportan un par de casos prácticos; éste es el primero de ellos, relativo a penicilina V-potásica: una primera disolución se prepara con una cantidad de 3,5 g. de penicilina V-ácida (0,01 moles) que se disuelve en 60 cm³ de etanol, consiguiéndose la total disolución al agitar la mezcla en baño de agua templada (30°-40° C); se prepara una segunda disolución con otra cantidad de 3,4 g. de clorhidrato de cipro-heptadina (0,01 moles) se disuelve en un vaso de precipitado de 400 cm³ en 200 cm³ de agua destilada caliente (60°-70° C); se alcaliniza por adición de disolución de hidróxido sódico en agua al 50% (p/p) hasta marcada alcalinidad, comprobada con papel universal de pH, formándose una emulsión blanca lechosa con separación de capa de aceite; se decanta la solución separándose el aceite y éste se disuelve en 100 cm³ de éter sulfúrico; con esta solución se lava, agitando en embudo de decantación, la emulsión lechosa separada; se deja en reposo hasta la disgregación de ambas fases y se decanta, recogiendo la fase acuosa sobre otro embudo de decantación; la fase acuosa se lava con tres porciones de 50 cm³ de éter sulfúrico cada una, recogiendo las porciones etéreas de lavado sobre la primera porción etérea; se decanta una pequeña porción de agua (si se ha separado alguna) de los extractos etéreos reunidos y éstos se desecan finalmente sobre cantidad suficiente de sulfato sódico anhidro; se filtra, recogiendo el filtrado sobre el frasco limpio y seco; el sulfato sódico retenido por el filtro se lava con 25 cm³ de éter anhidro que, al filtrar, se recoge con los anteriores filtrados de éter; de esta manera se obtiene la solución etérea de cipro-heptadina base. La solución primera se vierte sobre la solución segunda en agitación, sin apreciarse precipitación alguna al terminar la adición. El lote se deja en el congelador a una temperatura de -8° C, para que cristalice; la cristalización comienza aproximadamente a la hora de enfriamiento; a las 18 horas de reposo en frío se decanta el lote con comodidad, quedando adherida al cristizador una masa cristalina que finalmente se deseca al vacío sobre cloruro cálcico anhidro. El producto seco obtenido tiene las siguientes características: color y aspecto de polvo blanco cristalino, peso 5,2 g., rendimiento del 81,5% del teórico, actividad en penicilina V (por yodometría) 764 U.I./mg., punto de fusión 122°-125° C, humedad (Karl Fischer) 0,1%. La porción etérea filtrada, concentrada por destilación, dio una segunda cosecha del producto (1,2 g., que representó el 18,8% del peso teórico total obtenible) en forma de polvo amarillento, más impuro que en el caso anterior.

⁵¹⁶ AHOEPM, patente 280.470; la memoria descriptiva consta de catorce hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; está firmada en Madrid, a 25 de agosto de 1962. La empresa figura como domiciliada en Madrid, en el número 95 de la calle de Alcalá. La patente fue concedida el 24-IX-1962 y hecha publica el 16-I-1963.

clorhidrato de cipro-heptadina en el disolvente. El proceso de precipitación consiste en mezclar la primera y segunda soluciones; se estudió el rendimiento y calidad del producto obtenido, el orden de la adición (en casi la totalidad de los lotes se agregó la solución antibiótica sobre la de clorhidrato de la base), la temperatura de reacción (estas pruebas se realizaron entre 5° y 60° C), la influencia de la agitación, el tiempo de maduración y la temperatura de cristalización (pruebas a temperatura ambiente y 5° C); también se estudiaron los rendimientos y calidades en los lotes sucesivamente obtenidos en las aguas madre de anteriores precipitaciones.

Con ligeras excepciones, todos los procesos llevados a cabo, con las diversas variantes, conducen a productos de actividad próxima a la teórica y con buenos rendimientos; en muchos casos el producto obtenido en el seno del disolvente de precipitación se separa en forma de aceite, primero, que pasa por enfriamiento o desecación a sustancia resinoide, la cual, por total desecación, se convierte en sólido amorfo fácilmente pulverizable⁵¹⁷.

⁵¹⁷ Los autores proporcionan un ejemplo en cuanto al método operativo: utilizan 5,81 g. de penicilina V-potásica, 4,95 g. de clorhidrato de cipro-heptadina, 720 cm³ de solución metil-etil-cetona en agua al 6% (V/V) y 5 cm³ de metil-etil-cetona; como material emplean: vasos de precipitado que se puedan calentar, de forma baja, de 800 cm³ y de 50 cm³; motor de agitación de velocidad regulable, con agitado de paletas de vidrio o acero inoxidable; embudo de decantación de 10 cm³; baño termostático de agua regulable hasta 70° C; equipo de filtración al vacío (kitasato de 1 litro y buchner de 4 x 2 cm de altura interior); equipo de desecación. El proceso de manipulación es el siguiente: se prepara la primera disolución con 2,06 g. de penicilina V-potásica, contenidos en un vaso de precipitado de 50 cm³, se disuelven en 30 cm³ de solución cetónica, a temperatura ambiente. Previamente a la preparación de la solución primera debe procederse a preparar la solución segunda con arreglo a la siguiente técnica: se calienta en baño de agua 580 cm³ de una solución cetónica contenida en vaso de precipitado de 800 cm³ a 60° C, cubriendo ésta con vidrio de reloj para evitar la evaporación excesiva; alcanzada la temperatura de régimen se añade a la solución 1,65 g. de clorhidrato de cipro-heptadina, agitando toda la mezcla hasta disolución total (algunos lotes de clorhidrato de cipro-heptadina dejan en la superficie, o adherido al agitador, un pequeño residuo gomoso insoluble que se separa, caso de aparecer, con espátula, en lotes pequeños como el descrito; en lotes mayores puede eliminarse por filtración a 60° C). La solución primera se pasa cuantitativamente al embudo de decantación, desde el que se añadirá lentamente sobre la solución segunda, la cual seguirá en agitación y se introducirá en el baño termostático a 60° C. El vaso donde se efectuó la disolución primera se lava con 10 cm³ de solución de metil-etil-cetona en agua y, cuando haya terminado de vaciar el embudo de decantación, se lavará éste con los 10 cm³ de lavado del vaso y se adicionarán, a su vez, sobre el producto de reacción en agitación; terminado el paso por el embudo de ese primer lavado, se lavará una segunda vez con 20 cm³ de solución cetónica y se añadirá esa porción al cuerpo de reacción, continuando la agitación durante la adición y 30 minutos más después de terminado el goteo del líquido del segundo lavado. A partir del momento en que terminó la adición de aguas de lavado puede suspenderse la calefacción del baño y continuar la agitación a temperatura ambiente. A medida que ha ido progresando la adición del antibiótico se apreciará la aparición de turbidez. Transcurrido el tiempo adecuado de agitación se suspende ésta y se abandona el lote durante 14-18 horas a la temperatura ambiente, debidamente cerrado para evitar la evaporación excesiva. Terminado el tiempo de reposo se someterá el lote, nuevamente, a agitación moderada durante 45-60 minutos, al cabo de los cuales se filtrará con succión, recogiendo el precipitado, de aspecto cristalino, en buchner. El producto cristalino se deseca a baja temperatura (menos de 50° C) hasta alcanzar peso constante. En el laboratorio, la desecación se realizó a 45° C con infrarrojos durante 3 a 4 horas, pero puede emplearse estufa de vacío. Las aguas madre filtradas se pasarán del matraz kitasato al vaso de precipitados de 800 cm³ donde, siguiendo la manipulación indicada en la preparación de la segunda disolución, se disolverán 1,65 g. de clorhidrato de cipro-heptadina, pudiéndose apreciar, en algunos casos, la aparición de un ligero precipitado a medida que avanza la disolución, debido a la formación de nueva cantidad de sal de penicilina, por haber un ligero exceso de penicilina V remanente de la primera precipitación. Una vez preparada esta nueva disolución se hace la disolución tercera: 1,87 g. de penicilina V-potásica se disolverán en el vaso de precipitado de 50 cm³, en 30 cm³ de la solución cetónica. La disolución tercera se añadirá sobre la de clorhidrato de cipro-heptadina en agua madre, siguiéndose igual técnica que la indicada para la primera cristalización, haciéndose en esta paso un solo lavado de vaso y embudo con 10

2.2.6. Penicilinas asociadas a otros antibióticos

El 12 de julio de 1956, una empresa de nacionalidad italiana, *Leo Industrie Chimique Farmaceutiche*, presentó ante el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento para la preparación de sales de penicilina con compuestos sulfamidados”⁵¹⁸.

El procedimiento de esta invención se refiere a la preparación de compuestos de sulfamida y penicilina, obtenidos al hacer reaccionar:

- Compuestos sulfaminados de la estructura que se indica a continuación, en las cuales los núcleos bencénicos tienen radicales en posición para:

a) $(RR)N-SO_2-C_6H_4-CH_2-N-H(R)$

b) $(RR)N-SO_2-C_6H_4-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-C_6H_4-SO_2-N(RR)$

donde R puede representar el átomo de hidrogeno o bien agrupaciones alquílicas, de piridina, de tiazol y pirimidina, salificadas de forma que resulten hidrosolubles (por ejemplo en forma de acetatos) o que formen dispersiones acuosas.

- Con soluciones acuosas de una sal de penicilina en tal cantidad que origine derivados de mono-penicilina en el caso de los compuestos a), y de dipenicilina en el caso de los compuestos b).

Mediante la mezcla de las soluciones acuosas de las sales de los compuestos, bien del tipo a) o del tipo b), con las soluciones acuosas de las sales de penicilina, y en particular de la penicilina G, los autores señalan que han obtenido compuestos que incluyen en su estructura, respectivamente, una y dos moléculas de penicilina. Estos compuestos resultan muy estables, poco solubles en agua y no tóxicos, aun cuando se suministren en dosis superiores a las terapéuticas. Sus suspensiones acuosas, con adición o sin ella de sustancias tensoactivas, resultan fácilmente inyectables.

De acuerdo con la propuesta que elaboran estos autores, la actividad antibiótica de las suspensiones, y de las dispersiones en general, de estos compuestos no varía con el tiempo; por lo tanto, están indicadas particularmente en la preparación de suspensiones inyectables, de suspensiones en forma de jarabes, de comprimidos y de dispersiones en vehículos grasos, jabonosos y gelatinas.

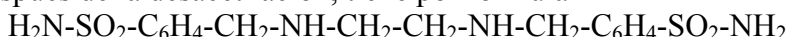
Los compuestos sulfaminados del tipo a) fueron preparados por sulfonación con clorhidrina sulfúrica de la bencil-amina acetilada, mediante un tratamiento del cloruro del ácido sulfónico con amoniaco o con una amina primaria o secundaria y, finalmente, por desacetilación, mediante ebullición del compuesto obtenido con ácido clorhídrico.

cm³ de la solución cetónica. Terminados los tiempos de agitación, reposo y nueva agitación, se filtra y se seca el producto cristalino obtenido en la primera cosecha. Las aguas madre recogidas se pasan al vaso de precipitados de 800 cm³, se adicionan 5 cm³ de metil-etil-cetona y se realiza una tercera precipitación enteramente análoga, en cantidades y manipulación, a las que se han indicado para la segunda cosecha de cristales. Los productos secos reunidos tienen las siguientes características: color y aspecto de polvo blanco cristalino, peso de 8,0 g., punto de fusión entre 130°-135° C, potencia yodométrica de 857 U.I./mg. (884 U.I./mg. en producto seco), humedad (Karl Fischer) 3%. El análisis elemental de una muestra de penicilina V-cipro-heptadina dio los siguientes resultados: C 69,68% (teóricos) / 65,19% (prácticos), H 6,16% (teóricos) / 6,00% (prácticos), N 6,59% (teóricos) / 6,94% (prácticos), S 5,03% (teóricos) / 5,11% (prácticos); la fórmula empírica es C₃₇H₃₉N₃O₅S.

⁵¹⁸ AHOEPM, patente 229.788; la memoria descriptiva consta de doce hojas, escritas a máquina por una sola cara; está fechada en Madrid, a 12 de julio de 1956; como domicilio social de la empresa figura *via* Guido d'Arezzo, 32. Roma (Italia). La patente española fue concedida el 2-II-1957 y publicada el 1-IV-1957.

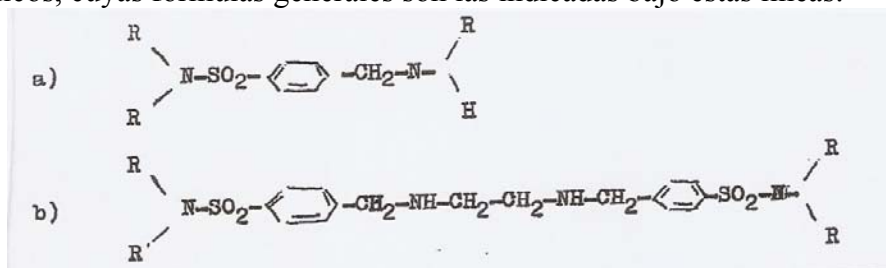
Los compuestos del tipo b) se obtuvieron sulfonando con clorhidrina sulfúrica la N,N'-dibencil-etilén-diamina acetilada, tratando el ácido sulfónico di-clorado que se obtiene con amoniaco o con aminas primarias o secundarias y, por último, desacetilando el compuesto obtenido, por ebullición, con ácido clorhídrico.

El compuesto sulfamídico que se logra tratando el ácido di-clorado con amoniaco, después de la desacetilación, tiene por fórmula



Este compuesto ha sido preparado provocando la reacción -en solución alcohólica, en solución hidroalcohólica o en suspensión acuosa-, y mediante ebullición, de la para-sulfamido-bencil-amina con di-bromo-etano simétrico. Los autores describen, mediante cinco ejemplos, las operaciones necesarias para conseguir el fin que se proponen; son éstos: preparación de la penicilina de para-sulfamido-bencil-amina⁵¹⁹; preparación de la bipenicilina del alfa,beta-bis-(para-sulfamido-bencil-amino)-etano; preparación del alfa,beta-bis-(para-sulfamido-bencil-amino)-etano; preparación de la bipenicilina de alfa,beta-bis-(para-metil-amido-sulfamido-bencil-amino)-etano; preparación de la bipenicilina del alfa,beta-bis-(para-dimetil-amido-sulfo-bencil-amino)-etano.

Algo más de tres años después, con fecha 5 de septiembre de 1959, esta misma empresa italiana, *Leo-Industrie Chimiche Farmaceutiche*, presentó ante la Administración española una solicitud de patente de invención destinada a proteger un "Procedimiento para la preparación de un compuesto de diferentes penicilinas con un compuesto de naturaleza sulfamídica"⁵²⁰, en particular de fenoxi-metil-penicilina y alil-mercapto-metil-penicilina, que se pueden obtener haciendo reaccionar compuestos sulfamídicos, cuyas fórmulas generales son las indicadas bajo estas líneas:



R representa el átomo de hidrógeno o agrupamientos alquílicos, piridínicos, tiazólicos y pirimidínicos salificados (que sean hidrosolubles en forma de acetatos, o que formen dispersiones acuosas), con soluciones acuosas de una sal de penicilina tomada en tal cantidad que produzca derivados monopenicilínicos en el caso de los compuestos a) y derivados dipenicilínicos en los compuestos tipo b).

⁵¹⁹ Nos ocupamos de éste, como caso ilustrativo: se disuelven 15 g. de clorhidrato de p-sulfamida-bencil-amina en 30 cm³ de agua; se prepara otra solución de 22 g. de penicilina G sódica en 30 cm³ de agua. Se mezclan ambas soluciones y, de la nueva mezcla, al cabo de un tiempo, se separa un compuesto que, lavado con agua fría y secado sobre anhídrido fosfórico, funde entre 122°-127° C, con desprendimiento de un gas. Si a una de las soluciones, antes de realizar la mezcla de ambas o en el momento de efectuar la misma, se añaden como cebo cristales del producto obtenido en una preparación precedente, la cristalización ocurre más rápidamente. En 1 mg. del compuesto (con ca. 4,5% de humedad), se encuentran hasta 1.070 U.I. de penicilina (teóricamente 1.090 U.I.). La solubilidad en agua del compuesto, a la temperatura ambiente, es del orden del 10%.

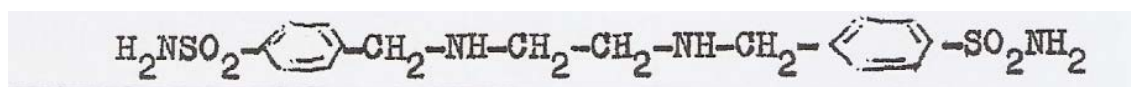
⁵²⁰ AHOEPM, patente 251.912; la memoria descriptiva consta de doce hojas, escritas a máquina por una sola cara; la empresa figura como domiciliada en el número 32 de *vía* Guido D'Arezzo, en Roma (Italia). La solicitud queda firmada, en Madrid, el 5-IX-1959; la concesión tuvo lugar el 11-III-1960 y la publicación el 16-V-1960.

Según los autores de esta memoria, estos compuestos, suministrados por vía oral, producen niveles sanguíneos superiores a otros semejantes; inyectados por vía intravenosa, muestran menos toxicidad que los compuestos de procaína y no influyen sobre los valores de la respiración y la presión. Los compuestos de naturaleza sulfamídica del tipo b) tienen una toxicidad muy inferior a la de la procaína y a la de la dibencil-etilén-diamina⁵²¹.

Los compuestos del tipo a) son preparados mediante sulfonación con la clorhidrina sulfúrica de la correspondiente bencil-amina acetilada o formilada, por tratamiento directo del producto de sulfonación con amoníaco o con una amina primaria o secundaria en solución helada, procediendo después a la desacetilación o desformilación, mediante ebullición del compuesto obtenido, con disoluciones de ácidos o de bases.

Los compuestos de tipo b) se preparan sulfonando, con clorhidrina sulfúrica, la N,N'-dibencil-etilén-diamina acetilada o formilada y tratando el ácido disulfónico doblemente clorado, que se ha obtenido por extracción, con disolvente del producto de sulfonación vertido en agua y hielo; también por simple precipitación con agua y hielo con solución de amoníaco, o aminas primarias y secundarias y, finalmente, desacetilando o desformilando el compuesto sulfamídico obtenido por tratamiento con ácidos o álcalis.

El compuesto sulfamídico que se obtiene al tratar el ácido disulfónico diclorado indicado con amoníaco, el alfa-beta-bis-(para-sulfonamido-bencil-amino)-etano, después de la desacetilación, tiene la fórmula cuya estructura se indica bajo estas líneas



Este compuesto también se puede obtener provocando la reacción en disolución alcohólica, en disolución acuoso-alcohólica o en suspensión acuosa y por ebullición de la para-sulfonamido-bencil-amina con di-bromo-etano simétrico. Los derivados de la fenoxi-metil-penicilina son especialmente adecuados para las preparaciones por vía oral. Los autores ilustran estos procedimientos con una serie de ejemplos⁵²².

⁵²¹ Los autores presentan datos experimentales realizados en ratones blancos: por vía intraperitoneal, la LD₅₀ del clorhidrato de procaína es de 192 mg./kg.; para el clorhidrato de dibencil-etilén-diamina es de 130 mg./kg.; para el acetato de alfa-beta-bis-(para-dimetil-amido-sulfon-bencil-amino)-etano es de 400 mg./kg., y para el correspondiente clorhidrato es de 525 mg./kg.

⁵²² Señalamos un par de ejemplos donde se explicitan los dos tipos de procedimientos objeto de esta patente:

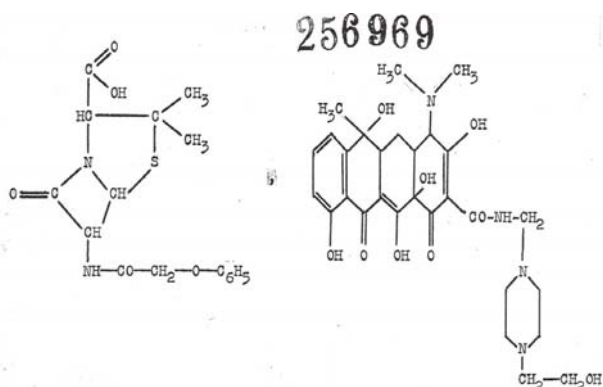
Preparación de la combinación fenoxi-metil-penicilínica de la para-sulfamido-bencil-amina: se disuelven 38,8 g. (0,1 moles) de fenoxi-metil-penicilina potásica en 160 cc. de agua. Simultáneamente, se disuelven 22,3 g. (0,1 moles) de clorhidrato de para-sulfamido-bencilamina en un volumen de 50 cc. de agua. Se mezclan las dos soluciones; al cabo de un rato se separa la sal de para-sulfamido-bencil-amina de la fenoxi-metil-penicilina; se seca al vacío. El producto tiene la siguiente composición centesimal: C: 51,35%, H: 5,42%, N: 10,10%, S: 12,02%; los valores calculados para C₂₃H₂₇O₇N₄S₂ son los siguientes: C: 51,48%, H: 5,26%, N: 10,50%, S: 11,95%.

Preparación de la combinación di-fenoxi-metil-penicilina del alfa-beta-bis-(para-sulfamido-bencil-amino)-etano: la preparación de este compuesto consta de dos partes; en la primera (A) se origina el compuesto de naturaleza sulfamídica, en la segunda (B) se hace reaccionar el compuesto (A) con la penicilina.

Primera parte (A): a una cantidad de 72 g. del diacetato de N,N'-dibencil-etil-amina en 200 cc. de agua se le añaden 60 cc. de anhídrido acético con vigorosa agitación; se forma un producto oleoso, que

El 30 de marzo de 1960, la empresa francesa *Société d'Etudes de Recherches et d'Applications Scientifiques et Médicinales* (E.R.A.S.M.) presentó, ante el registro español de patentes, una solicitud para proteger, por veinte años, un "Procedimiento para la obtención de fenoxi-metil-penicilinato de N² [ó 9, ó 7]-4'-(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-metil-tetraciclina, de acción antibiótica"⁵²³; este compuesto presenta, como propiedades características, el ser bastante soluble en agua y, de otra parte, la de su práctica insensibilidad a la penicilinasas.

El compuesto al que alude esta patente, el fenoxi-metil-penicilinato de N² [ó 9, ó 7]-4'-(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamina-metil-tetraciclina, presenta, probablemente, una estructura próxima a la que sigue a estas líneas.



Aunque los propios autores señalan que "conviene observar que no ha podido determinarse con certeza este fórmula compleja, en lo particular por lo que atañe al lugar de sustitución en el anillo de tetraciclina" y que sólo tiene valor indicativo la fórmula con enlace en posición N.

al enfriarlo en hielo se coagula originando una masa cristalina blanca; esta masa cristalina se vuelve a cristalizar con alcohol metílico. La N,N'-diacetil-N,N'-dibencil-etilén-diamina obtenida, o bien la cantidad correspondiente de N,N'-diformal-N,N'-dibencil-etilén-diamina, es introducida lentamente en 3,5-5 partes de clorhidina sulfúrica; terminada la adición, se añaden 0,25 partes de cloruro sódico y el conjunto se calienta a 70°-80° C durante 4-5 horas. Se deja enfriar el líquido de reacción y se vierte a chorro fino en 20 partes de hielo triturado; se logra un producto de aspecto gomoso que, lavado con un poco de agua helada, se introduce y se disuelve, aún húmedo, en 2,5 partes de una disolución acuosa concentrada de amoníaco. Al cabo de varias horas de haber realizado la mezcla, se evapora gran parte del amoníaco en exceso, se deja enfriar y se filtra; el producto sólido se desacetila o se desformila al hervirlo durante algunas horas con 5-8 partes de ácido clorhídrico 1 N; se obtiene así el di-clorhidrato del alfa-beta-bis-(para-sulfamido-bencil-amino)-etano. La base de este compuesto funde a 210°-212° C y en forma de diacetato sirve para la preparación del compuesto dipenicilínico. En el caso del formil derivado, se puede desformilar también por calentamiento con disolución normal de sosa cáustica.

Segunda parte (B): se disuelven 77,7 (0,2 moles) de fenoxi-metil-penicilina potásica en 320 cc. de agua; simultáneamente se disuelven 39,8 g. (0,1 moles) de alfa-beta-bis-(para-sulfamido-bencil-amino)-etano en 3.000 cc. de agua que contiene 15 g. de ácido acético glacial. Se añade la segunda disolución a la primera, enfriando y agitando vigorosamente; se forma un precipitado voluminoso que, con el tiempo, se vuelve cristalino; la cristalización se favorece añadiendo una pequeña cantidad del producto preparado anteriormente, que sirve de cebo. Se filtra, lava y seca al aire. El producto resultante es la combinación de dos moléculas de fenoxi-metil-penicilina y una de alfa-beta-bis-(para-sulfamido-bencil-amino)-etano, contiene cuatro moléculas de agua de cristalización.

⁵²³ AHOEPM, patente 256.969; la memoria consta de 19 páginas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, acompañadas de una lámina de dibujos; queda firmada en Madrid, a 30 de marzo de 1960; el expediente cuenta con prioridad de la patente británica n° 10.887/59 de 31 de marzo de 1959; la empresa figura domiciliada en 67 avenue de Wagram, Paris (Francia). La patente española fue concedida el 30-VII-1960 y hecha pública el 16-X-1960.

El procedimiento de obtención de este producto se basa en una reacción que origina la unión de las tres porciones fundamentales de la molécula; consiste en hacer reaccionar, en un disolvente común, cantidades equimolares de fenoxi-metil-penicilina, tetraciclina base y N-hidroxi-etil-N'-hidroxi-metil-dietilén-diamina. La reacción conviene realizarla en caliente, a una temperatura de *ca.* 40 ° C.

Las diferentes técnicas varían según la naturaleza del disolvente empleado. Cuando el disolvente común es el agua, el producto se puede aislar por liofilización; pero si el disolvente es un compuesto orgánico, como metanol o isopropanol, se puede aislar por precipitación mediante éter y filtración.

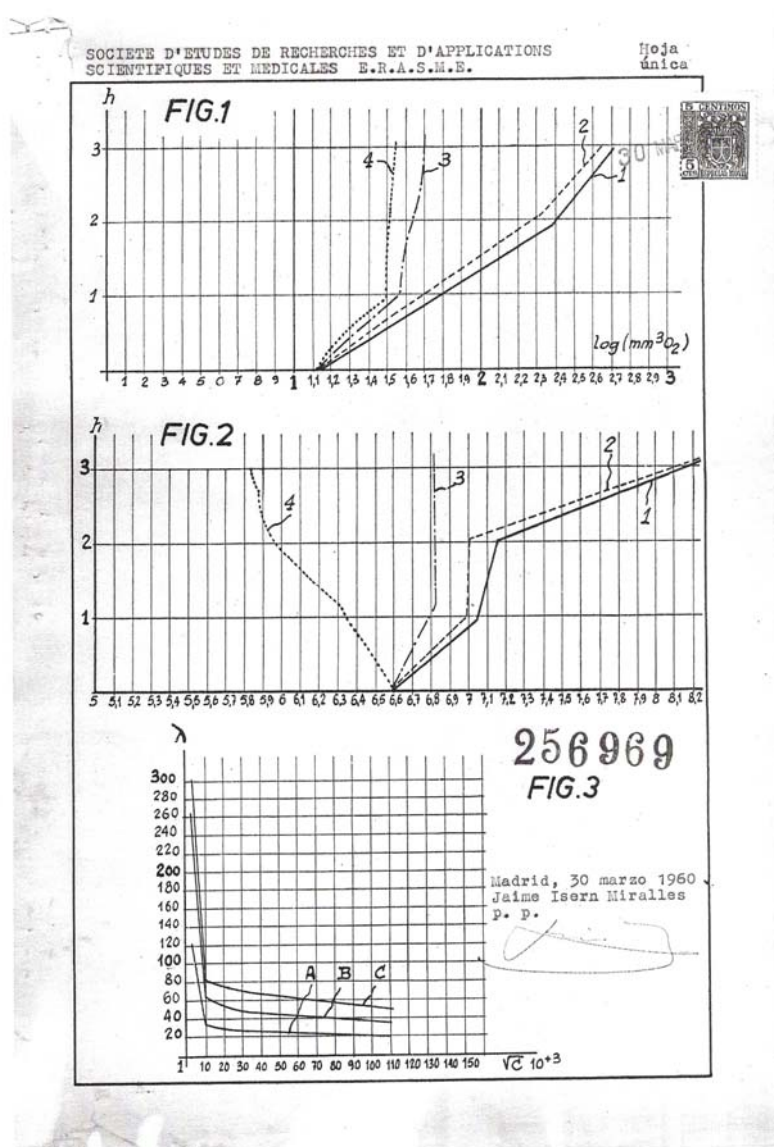
Los autores consideran dos variantes de puesta en práctica de este procedimiento. Según la primera, se introducen en una solución caliente N-hidroxi-etil-N'-hidroxi-metil-dietilén-diamina, el derivado de penicilina y la tetraciclina base; esto se puede realizar incorporando cada reactivo individualmente o en mezcla, tanto en una sola vez como en porciones. Según una segunda variante, la N-hidroxi-etil-N'-hidroxi-metil-dietilén-diamina es preparada *in situ*, haciendo reaccionar la N-beta-hidroxi-etil-dietilén-diamina con formaldehído, adicionando simultáneamente -o no- los cuatro reactivos. La elección de una u otra de estas variantes depende de la comodidad y de la eficacia en el aislamiento y la purificación del producto final⁵²⁴.

El producto obtenido se presenta en forma de un polvo amarillo, inodoro, algo amargo, muy soluble en agua (más de 1,5 g./cm³), soluble en metanol y etanol e insoluble en éter. Una solución acuosa de este producto al 2% tiene un pH de 5,6, un punto de fusión entre 142°-155° C (con descomposición), (alfa) 20/D = -50,5 +/- 2 (en solución al 2% en etanol) y un análisis porcentual de C (56,41%), H (6,11%), N (6,11% [sic]) y S (3,36%), lo que remite a la fórmula C₄₅H₅₆N₆O₁₄ [C (57,67%), H (6,02%), N (8,9%) y S (3,42%)]. Por su gran solubilidad y el pH de la solución obtenida, es posible la administración de este compuesto por vía intramuscular o, incluso, intravenosa.

Los autores comprobaron, de manera experimental, que la mortalidad en lotes de ratones blancos infectados por estafilococos resistentes a la penicilina es netamente menor en los lotes tratados con fenoxi-metil-penicilinato de N² [ó 9, ó 7]-4'(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-metil-tetraciclina que en los tratados con N² [ó 9, ó 7]-4'-(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-metil-tetraciclina. Se determinaron los espectros antibacterianos de varias cepas, de los resultados obtenidos se deduce que la dosis mínima inhibitoria (D.M.I.) es notablemente débil, por lo que para evaluar esta dosis conviene tener en cuenta el hecho de que el compuesto a que se refiere este procedimiento incluye una porción 'penicilina' y una porción 'tetraciclina'. De la misma manera, conviene señalar que la toxicidad del producto resulta únicamente de la proporción 'tetraciclina'.

⁵²⁴ Los autores ilustran este procedimiento con algunos ejemplos de puesta en práctica; nos ceñiremos al primero de ellos, en él se relata la formación previa de N-hidroxi-etil-N'-hidroxi-metil-dietilén-diamina, para ello se prepara primeramente una solución de 6,63 g. de beta-hidroxi-etil-dietilén-diamina y 3 g. de formalina al 38%, por calentamiento de estos reactivos a una temperatura de 60°-70° C en 200 cm³ de metanol; se deja en reposo una hora y, a continuación, se agregan a esta solución, más o menos simultáneamente, 22,2 g. de tetraciclina base anhidra y 17,5 g. de fenoxi-metil-penicilina anhidra, y se calienta la mezcla en un baño de aceite a 40° C durante 90 minutos; la disolución completa se obtiene en *ca.* 30 minutos; la mezcla reactiva se vierte en 600 cm³ de etanol, agitando al mismo tiempo. El producto que precipita se filtra, se lava dos veces con éter y se seca en vacío, a 40° C, durante 5 horas. Se obtienen así 40 g. de fenoxi-metil-penicilinato de N² [ó 9, ó 7]-4'(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-metil-tetraciclina. El rendimiento ha sido de 85%-90%.

Se realizaron mediciones bacteriológicas empleando el aparato de Warburg: curvas de consumo de oxígeno de las bacterias, que evidencian su actividad respiratoria, y curvas de proliferación de las bacterias. De la comparación de estas curvas se desprende que la N^2 [ó 9, ó 7]-4'-(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-metil-tetraciclina tiene una acción completamente diferente y superior.



La figura 1 muestra la variación del consumo de oxígeno en las bacterias; la figura 2 indica la proliferación de *Staphylococcus aureus*. Cada figura posee un juego de curvas, que se han nombrado por 1, 2, 3 y 4, en ellas se presentan los resultados observados en los cuatro casos siguientes:

Curva 1: No se ha aplicado ningún antibiótico (control).

Curva 2: Se ha aplicado fenoxi-metil-penicilina (0,23 mcg./cc).

Curva 3: Se ha aplicado N^2 [ó 9, ó 7]-4'-(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-tetraciclina (0,4 mcg./cc.).

Curva 4: Se ha aplicado N^2 [ó 9, ó 7]-4'-(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-metil-tetraciclina (0,63 mcg./ cc).

A simple vista parece que las dosis aplicadas para obtener las curvas 2, 3 y 4 son diferentes, pero no es así, pues la dosis de 0,63 mcg./cc. de la curva 4 equivale a la suma de los 0,23 mcg./cc. de la curva 2 y de los 0,4 mcg./cc. de la curva 3.

Las curvas de la figura 1 están expresadas en logaritmos de la cantidad, en milímetros cúbicos, de oxígeno consumido por las bacterias en función del tiempo en horas. Las curvas de la figura 2 están expresadas en logaritmos del número de microorganismos vivos en función del tiempo en horas.

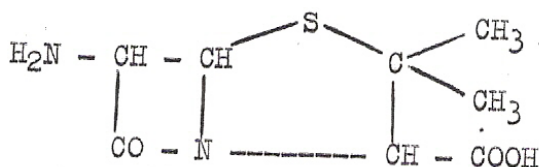
En la figura 1 se comprueban los mejores resultados del producto a que se refiere este procedimiento sobre la inhibición de la respiración de *Staphylococcus aureus*; mientras las curvas 1 y 2 indican un crecimiento del número de microorganismos, la curva 3 representa un número constante, es decir, solamente una bacteriostasa; la curva 4 indica una disminución creciente de este número, es decir, una acción bactericida.

Es digno de notar, refiriéndose a la fórmula desarrollada que se ha indicado al inicio de nuestro comentario, que la porción de tetraciclina de dicha fórmula corresponde a una sustancia de acción puramente bacteriostática, que la porción diamino-heterocíclica sustituida corresponde a una sustancia bactericida, mientras que la molécula compleja del producto a que se refiere este procedimiento es enteramente soluble y ejerce una acción bactericida sobre todas las bacterias gram-positivas productoras de penicilinas; precisamente en esta propiedad reside la originalidad e interés del producto.

A diferencia de las sales de la porción de tetraciclina distintas del fenoxi-metil-penicilinato, este nuevo compuesto no experimenta más que una ionización muy débil y progresiva, de modo que cada porción de la gran molécula compleja no interviene individualmente sino que es esta gran molécula la que actúa en su conjunto. Esta teoría se justifica comparando los puntos crioscópicos y los valores de las resistividades de soluciones de diferentes sales de la N² [ó 7, ó 9]-4'-(beta-hidroxi-etil)-dietilén-diamino-metil-tetraciclina.

2.2.7. Penicilinas sintéticas: derivados del ácido 6 amino-penicilánico (6-APA)

Tras el hallazgo, en enero de 1959, por un grupo de investigadores vinculados a los *Beecham Research Laboratories Ltd.*: Frank Ralph Batchelor, Frank Peter Doyle, John-Herbert-Charles Nayler y George Newbolt Rolinson, del ácido 6-amino-penicilánico (6-APA), un producto acumulado en el medio de cultivo durante el proceso de fermentación de la penicilina⁵²⁵, definido como el núcleo fundamental de la molécula, este ácido se convirtió en la base para la obtención de compuestos sintéticos de las penicilinas; la adición de diferentes moléculas sobre el 6-amino-penicilánico determina la farmacología esencial y las propiedades antibacterianas de estos compuestos.



Estructura del ácido 6-amino-penicilánico (AHOEPM, patentes 252.422, 255.209)

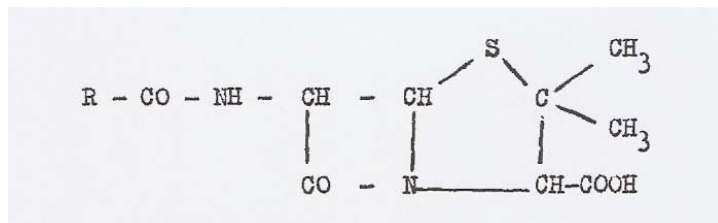
2.2.7.a. Procedimientos de obtención

Con fecha 22 de enero de 1960, la empresa inglesa *Beecham Research Laboratories Limited* presentó, ante la Administración española, un expediente para

⁵²⁵ Frank Ralph BATCHELOR, Frank Peter DOYLE, John Herbert Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON. "Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations" *Nature*, 183: 257-258. Londres, 1959.

proteger una patente de invención relativa a un “Proceso para la preparación de ácido 6-amino-penicilánico”⁵²⁶, realizado por medio de la degradación enzimática de algunas penicilinas. El procedimiento fue desarrollado por los investigadores británicos George Newbolt Rolinson, Merfin Richards y Frank Ralph Batchelor.

Durante el proceso, una penicilina de fórmula general como la representada bajo estas líneas, o un licor de fermentación que contenga tal penicilina, reacciona con un preparado enzimático derivado de un microorganismo productor de amidasa penicilínica



R significa un grupo alquilo o alquilenos, o el grupo R^1-XCH_2 , donde R^1 es un grupo alquilo, alquilenos, alilo o arilo y X es oxígeno o azufre.

Como ejemplos de penicilinas que pueden emplearse como sustratos en este procedimiento, los autores citan: fenoxi-metil-penicilina (penicilina V), butil-tiometil-penicilina, n-heptil-penicilina (penicilina K), 2-pentenil-penicilina (penicilina F), n-amil-penicilina (dihidro-penicilina F) y n-butil-penicilina. También es posible emplear como sustrato una mezcla de las penicilinas naturales producidas en un proceso de fermentación, en el cual no se emplea ningún precursor⁵²⁷.

Las penicilinas obtenidas por este procedimiento pueden ser usadas en forma de sal, tal que el catión de ésta no entorpezca la hidrólisis enzimática. Las sales más empleadas son las alcalinas y las alcalino-térreas (sales de sodio, calcio y potasio).

En cuanto a los organismos productores de amidasa penicilínica, los autores mencionan: hongos (*Alternaria* sp.pl., *Aspergillus* sp.pl., *Botrytis cinerea*, *Epicoccum* sp.pl., *Fusarium* sp.pl., *Mucor* sp.pl., *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* sp.pl., *Phoma* sp.pl. y *Trichoderma* sp.pl.) y levaduras (*Cryptococcus albidus*, *Trichosporon* sp.pl., *Actinomicetos* y *Streptomyces* sp.pl.). Producida la enzima, se separa el microorganismo, quedando así un licor claro que contiene la enzima.

La reacción entre la penicilina y el preparado enzimático puede efectuarse añadiendo la penicilina a la mezcla, o al revés, es decir añadiendo una solución de penicilina a la enzima dializada, incluso es preferible añadir la penicilina a una solución de un preparado enzimático precipitado en acetona⁵²⁸. La enzima muestra un pH óptimo alrededor de 9,0; si el pH es menor de 7, la enzima se torna inactiva. El proceso se ha de

⁵²⁶ AHOEPM, patente 255.210; la memoria descriptiva consta de trece páginas mecanografiadas, numeradas y escritas por una sola cara; como domicilio social de la empresa figura Great West Road, Brentford (Middlesex, Inglaterra). El expediente, basado en las solicitudes británicas nº 3439/59 del 30-I-1959 y nº 9043/59 del 16-III-1959, fue firmado en Madrid, el 22 de enero de 1960; la patente fue concedida el 22-II-1960 y publicada el 1-VI-1960.

⁵²⁷ En dicha mezcla se incluye la penicilina K, penicilina F, dihidro-penicilina F y 3-pentenil-penicilina, habiendo también algo de bencil-penicilina (penicilina G) y p-hidroxi-bencil-penicilina (penicilina X), por lo que este proceso es aplicable al licor de fermentación obtenido de la producción de ácido 6-amino-penicilánico, aumentando así la producción de él.

⁵²⁸ La enzima dializada se prepara al tratar el licor que la contiene con sulfato amónico, separar el precipitado formado, volver a disolverlo en agua y dializarlo en una contracorriente de agua. El preparado enzimático precipitado en acetona se prepara adicionando a un volumen de licor aclarado un volumen igual de acetona. Se recoge el precipitado formado, que puede usarse inmediatamente, al disolverlo en agua, o bien se puede almacenar indefinidamente, en forma de polvo, si se lava con acetona y se seca al vacío.

realizar a una temperatura entre 25° y 60° C. La penicilina es añadida en condiciones asépticas. Se deja que el estado de la ‘semilla’ se desarrolle durante 24 a 48 horas, con lo cual la totalidad de la mezcla se convierte en material inoculable para la fermentación final. Una porción de la ‘semilla’ se inocula en una carga mayor de medio de cultivo y se añade asépticamente una penicilina al medio; estas adiciones de penicilina tienen por objeto inducir la formación de la enzima de amilasa penicilínica. Es necesario dejar que se desarrolle la fermentación final por un espacio de tiempo; luego se añade una cantidad de penicilina para conseguir su conversión en ácido 6-amino-penicilánico. El proceso se lleva a cabo a un pH que depende del microorganismo que se utilice. Cuando ha ocurrido la reacción completa se separa el líquido del microorganismo y de los residuos sólidos del medio de cultivo. El ácido 6-amino-penicilánico puede recuperarse de la solución acuosa.

El 7 de abril de 1960 la empresa alemana *Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft* presentó un expediente, ante la Administración española, destinado a proteger un “Procedimiento para la obtención de ácido 6-amino-penicilánico”⁵²⁹. Los autores señalan que este ácido se puede obtener, con buenos rendimientos y sin grandes dificultades técnicas, si las suspensiones o extractos de las bacterias se dejan reaccionar sobre las penicilinas. Les resultan especialmente útiles las suspensiones o los sustratos de bacterias gram-negativas, por ejemplo de *Escherichia coli*, *Proteus* sp.pl., *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella* sp.pl. y *Shigella* sp.pl. Los autores plantean que posible, en lugar de utilizar los extractos o suspensiones de bacterias, que puedan emplearse también las enzimas libres de células o un enriquecimiento de enzimas obtenidas de éstas.

El procedimiento patentado consiste en hacer reaccionar las suspensiones de estos microorganismos sobre las penicilinas, en presencia de toluol o cloroformo. Las penicilinas empleadas tienen concentraciones de 500 a 60.000 U.I./cm³. La temperatura del proceso depende de la clase de organismo empleado; pero la temperatura de reacción está comprendida entre 0° y 40° C, con preferencia entre 20° y 40° C y, en especial, alrededor de los 37° C. El pH al cual se realiza el proceso está comprendido entre 5 y 9 preferentemente entre 6,5 y 8. El tiempo de reacción depende de la cantidad de penicilina empleada y puede variar entre 15 minutos y 24 horas, pero lo conveniente es escoger una cantidad de productos de manera que la reacción dure, aproximadamente, 5 horas. Si estas condiciones de trabajo se mantienen, las penicilinas se transforman, prácticamente en cantidad cuantitativa, en ácido 6-amino-penicilánico⁵³⁰.

⁵²⁹ AHOEPM, patente 257.220; la memoria descriptiva consta de ocho hojas, escritas a máquina por una sola cara; como domicilio de la empresa figura Leverkusen-Bayerwerk (Alemania). El expediente presentado ante la Administración española, con fecha de 7 de abril de 1960, tiene como base el aprobado por la Administración alemana con número 28.260/59, de 18-IV-1959; la patente española fue concedida el 29-IV-1960 y publicada el 16-VI-1960.

⁵³⁰ Los autores ilustran su procedimiento con una serie de ejemplos, reseñamos dos del conjunto propuesto.

Ejemplo A: una suspensión densa de células desarrolladas de *Escherichia coli* de la cepa ATCC 11-105, se suspendieron en un amortiguador de fosfato de pH 6, al cual se le agregó penicilina G sódica con una concentración de 5.000 U.I./cm³; a continuación se añade un 0,4% de toluol y se guarda la solución durante 18 horas a 37° C; se tomaron 7,5 l. del preparado enzimático y se completaron con acetona a 30 l.; el precipitado formado se centrifugó. La solución se concentró por evaporación al vacío a 3,88 l., se ajustó el pH a 2,6 y se extrajo con dos litros de acetato butílico. El residuo acuoso se ajustó, con una solución de hidrógeno-carbonato sódico, a un pH de 4,3 y, después de aclarar a través de un filtro

Con fecha 27 de agosto de 1960, la empresa alemana *Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft* presentó, ante el registro de patentes español, un expediente destinado a proteger un “Procedimiento para la acilación enzimática de ácido 6-amino-penicilánico”⁵³¹.

Mantienen los autores que las bacterias, en valores de pH por debajo de 5,5 y en presencia de ácidos carbónicos, sus sales o derivados, pueden ligar el grupo amínico en el ácido 6-amino-penicilánico, formándose ácidos 6-acilo-amino-penicilánicos. Para esta síntesis son útiles las bacterias que están capacitadas para sintetizar enzimáticamente el ácido fenil-acético y el ácido 6-amino-penicilánico⁵³², especialmente aquéllas que, a valores de pH más elevados, atacan la unión amídica en la posición 6 de la molécula de penicilina. Se pueden emplear las mismas bacterias para la disociación del ácido 6-amino-penicilánico de la penicilina y, a continuación, para la acilación del ácido⁵³³; con estas bacterias es posible obtener numerosos derivados 6-acílicos del ácido 6-amino-penicilánico, si se adicionan los correspondientes ácidos carbónicos -sus sales o derivados- a la mezcla de reacción, siendo muy adecuadas las amidas N-sustituidas de estos ácidos carbónicos, concretamente aquellas amidas que tienen como sustituyente un resto carboxi-alquílico. Las síntesis se efectúa a valores de pH entre 4,0 y 5,5, preferentemente a pH 4,5, en presencia de tolueno, cloroformo u otros agentes de conservación usuales en los trabajos enzimáticos. La temperatura de reacción puede oscilar entre 10° y 45° C, pero preferentemente es de 37° C. Los ácidos empleados se utilizan en concentraciones de 0,1% a 10%; su cantidad debe superar la necesaria para la acilación cuantitativa del ácido 6-amino-penicilánico.

Los autores comprobaron experimentalmente la aptitud para la acilación de una serie de derivados del ácido carbónico, en presencia de una enzima, indicado la actividad penicilínica media de penicilina G-estándar, en ensayo de placas, contra *Baccillus subtilis* ATCC 6633.

Seitz-K3, se concentró en vacío a 300 cm³. Se presentó una cristalización espontánea; los cristales se centrifugaron y, en porciones, se lavaron con 300 cm³ de agua helada y 150 cm³ de acetona, después se secaron. De la lejía madre se puede obtener una fracción, algo impura, del ácido 6-amino-penicilánico.

Ejemplo B: a una suspensión densa de células lavadas de la cepa de laboratorio *Escherichia coli* CN-2, que se encuentra en solución de amortiguador fosfático de pH 7,5, se le añade penicilina G sódica hasta una concentración de 10.000 U.I/cm³; se le agrega 0,0005% de 2,4-dinitro-fenol, como agente de conservación; se guarda la solución durante 9 horas a 37° C. De esta solución se puede aislar el ácido 6-amino-penicilánico, como se ha indicado en el ejemplo A.

⁵³¹ AHOEPM, patente 260.626; la memoria descriptiva consta de diez hojas escritas a máquina, por una sola cara; como domicilio social de la empresa figura Leverkusen-Bayerwerk (Alemania). La memoria, construida sobre un expediente aprobado por la Administración alemana: 29.459/59 [24-IX-1959], fue presentada el 27-VIII-1960, concedida el 14-IX-1960 y publicada el 16-XI-1960.

⁵³² Señalan los autores que es fácil seleccionar las bacterias adecuadas, poniendo una solución acuosa al 1% de acetato de potasio fenólico, que contenga 0,025% de ácido 6-amino-penicilánico, a un pH de 4,5 y mezclándola con una suspensión de las bacterias a comprobar. Si transcurridas dos horas de incubación a 37° C, en 1 cc. de solución, hay más de 10 unidades de penicilina G, las bacterias son adecuadas para esta síntesis.

⁵³³ La actividad sintetizadora de las bacterias se puede incrementar ventilando sus caldos de cultivo, que preferentemente contienen agua de remojo de maíz, con cantidades reducidas de hidratos de carbono y ácidos orgánicos, a los cuales se les adiciona, durante el crecimiento bacteriano, ácido fenil-acético, o sus derivados, en cantidades que oscilan de 0,002% hasta 2%.

Esta patente tuvo un certificado de adición, presentado con fecha 10 de septiembre de 1962, por la misma *Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft*, destinado a proteger “Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 260.626, concedida en 14 de septiembre de 1.960, por ‘Procedimiento para la acilación enzimática de ácido 6-amino-penicilánico’”⁵³⁴.

En la patente principal quedó descrito un procedimiento para la obtención de ácidos 6-amino-penicilánicos en presencia de ácidos carbónicos, sus sales o derivados, a un pH máximo de 6,5; este procedimiento se puede emplear, con especial ventaja, cuando, como derivados del ácido carbónico, se utilizan ésteres o amidas de los ácidos alfa-amino-fenil-acéticos. Según los autores, ha de procederse protegiendo el grupo amínico primario en el alfa-amino-fenil-acético mediante acilación⁵³⁵; se presenta una ligazón en forma de amida de ácido del grupo carboxílico del ácido carbenzoxi-alfa-amino-fenil-acético, con el grupo amínico en la posición 6 del ácido 6-amino-penicilánico; para terminar la síntesis se ha de disociar el resto de carbobenzoxi⁵³⁶.

Las alfa-amino-bencil-penicilinas obtenidas por este procedimiento son activas frente a una serie de bacterias gram-negativas. Los autores complementan la memoria con un par de ejemplos⁵³⁷.

El 12 de julio de 1961, la empresa francesa *Société des Usines Chimiques Rhone-Poulenc* presentó, ante el registro español, la solicitud de una patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento para la obtención de nuevos derivados del ácido amino-6penicilánico [*sic*, por 6-amino-penicilánico]”⁵³⁸, de carácter

⁵³⁴ AHOEPM, patente 280.828; la memoria descriptiva consta de seis hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras; la empresa figura como residente en Leverkusen-Bayerwerke (Alemania). El expediente goza de prioridad alemana: 35079/61, otorgada el 7-X-1961. La memoria fue presentada con fecha 15-IX-1962, concedida el 10-XI-1962 y publicada el 16-II-1963.

⁵³⁵ Esta protección puede realizarse con éster bencilico del ácido clorofórmico; la glicina carbobenzoxi-alfa-fenilica se transforma en un anhídrido de ácido mixto reactivo y éste se deja reaccionar con el ácido 6-amino-penicilánico.

⁵³⁶ Según los autores, evitando las dificultades de síntesis apuntadas, se logra unir la amida alfa-fenil-glicilica o el éster alfa-fenil-glicin-etilico por reacción enzimática, directamente, con el ácido 6-amino-penicilánico.

⁵³⁷ Ambos muy similares; dejamos anotado el primero de ellos: una cantidad de 160 l. de solución de agua de esponjamiento de maíz al 2% en volumen, que contienen 0,2% de fenil-acetato potásico, se lleva a un pH de 7,0 con KOH y se calienta, durante 30 minutos, a 120° C; se enfría y se clarifica la solución por centrifugación, se esteriliza durante 40 minutos, a 110° C, en el fermentador; se enfría y se inyecta con 400 cm³. de un cultivo de agitación de 18 horas de *Escherichia coli* [ATCC 11-105]; el preparado se airea con 150 l. de aire por minuto a 150 revoluciones por minuto y se cultiva durante 17 horas a 31° C, sin sobrepresión. Durante el crecimiento, se introducen 5 l. de dióxido de carbono por minuto dentro del cultivo; las células de las bacterias se separan por centrifugación de la solución del cultivo, se lavan en 16 l. de solución NaCl al 0,9% y, después de volver a separar por centrifugación, se suspende en una solución de fosfato 1/15 ml. a pH 6,0. A esta suspensión se agregan 0,125% de ácido 6-amino-penicilánico, 1% de amida alfa-fenil-glicilica y 0,2% de tolueno; la mezcla de reacción, con NaOH, se lleva a pH 6,0 y se guarda durante 1 hora a 37° C. En la reacción enzimática se han formado 509 unidades de alfa-amino-bencil-penicilina por cm³ de mezcla de reacción.

⁵³⁸ AHOEPM, patente 269.080; la memoria descriptiva consta de 16 hojas escritas a máquina por una sola cara; como domicilio social de la empresa figura el número 21 de la *rue Jean-Goujon*, París (Francia). El expediente se construye sobre la patente francesa 850.033/61, de fecha 18-I-1961; fue presentada el 12-VII-1961, concedida el 30-X-1961 y publicada el 16-XII-1961.

industrial, a partir de soluciones acuosas impuras, como por ejemplo los mostos de fermentación que suelen contenerle.

En definitiva, el procedimiento consiste en transformar, en el seno de la solución acuosa, el ácido 6-amino-penicilánico en una combinación apta para ser extraída mediante un disolvente orgánico no miscible en agua y relativamente débil para poder regenerar el ácido libre en una fase posterior. Son adecuadas para la realización de este procedimiento las iminas formadas por condensación del ácido 6-amino-penicilánico con un aldehído⁵³⁹. La reacción se realiza añadiendo de 1 a 30 moles de aldehído por mol de ácido 6-amino-penicilánico, a la solución acuosa donde se encuentra; se debe agitar enérgicamente; se opera a un pH entre 6 y 9 y a una temperatura comprendida entre 0° y 30° C, durante varias horas.

La imina obtenida se obtiene de la solución por extracción, después de acidificar a un pH comprendido entre 1 y 4, por medio de un disolvente no miscible con el agua. En razón a la reducción de la estabilidad de la imina es preferible realizar la extracción a temperaturas entre 0° y 5° C, antes de realizar la acidificación. Se consigue el mejor rendimiento efectuando rápidamente la extracción después de la acidificación a un pH entre 2,3 y 2,7. El empleo de una instalación centrífuga de extracción de varias etapas resulta muy conveniente para la ejecución de este procedimiento.

La imina puede ser aislada de la solución por diferentes métodos:

- Por precipitación en forma de sales insolubles, como las sales de sodio o de potasio, después de la concentración de la solución a baja temperatura y neutralización por la base correspondiente, o adición de una sal de sodio soluble en el disolvente.

- Extracción de la imina por agua, ajustando el pH entre 6 y 9, con un agente alcalino y precipitar después de la solución acuosa una sal de imina que sea insoluble en agua, siendo preferible efectuar la precipitación sobre una solución acuosa bastante concentrada, lo cual se consigue concentrando a presión reducida, bien sea la solución en el disolvente antes de la extracción por agua o bien sea la solución acuosa misma.

- Efectuar varias extracciones sucesivas, comenzando por el disolvente a un pH entre 6 y 9, luego la solución acuosa por medio de un disolvente en medio ácido y, de nuevo, agua a un pH entre 6 y 9, reduciendo los volúmenes en cada etapa.

Como se ha indicado, es necesaria la regeneración del ácido 6-amino-penicilánico; esta regeneración se efectúa a partir de la sal de imina, por hidrólisis, a través de una solución diluida del ácido. La reacción se realiza entre 0° y 30° C, pero como el producto tratado es poco estable, es preferible enfriar el medio de reacción entre 0° y 5° C. La imina bruta se suspende en agua a una concentración de 4% a 20%, luego se acidifica con un ácido fuerte, a un pH comprendido entre 1 y 2; se añade, manteniendo la agitación, un disolvente no miscible con el agua, capaz de extraer el aldehído libre⁵⁴⁰. Después de la agitación, con una duración de 15 a 60 minutos, se elimina eventualmente un producto insoluble por filtración y se separa la fase acuosa. El ácido 6-amino-penicilánico cristaliza de la solución acuosa a un pH entre 3 y 5, preferentemente entre 3,3 y 3,6, por medio de un agente alcalino, como sosa, potasa o amoníaco; se aísla y se seca. Puede obtenerse una segunda fracción por concentración

⁵³⁹ Los aldehídos adecuados son, según los autores de esta memoria: fórmico, acetaldehído, butiraldehído, aldehído aminico, aldehído benzoico o aldehído salicílico.

⁵⁴⁰ Estos disolventes pueden pertenecer al grupo de los alcoholes, como butanol; pentanoles; ésteres, como el acetato de etilo o el acetato de amilo; disolventes clorados como el cloroformo o el cloruro de metileno o carburos como el benceno o el hexano. El empleo de butanol es adecuado pues puede, además, extraer ciertas impurezas.

de la solución madre a presión reducida, baja temperatura y reajuste del pH al valor señalado anteriormente.

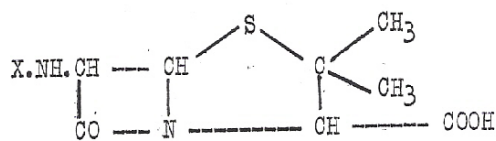
Los mostos de fermentación se tratan según los métodos anteriormente descritos; de ellos se obtiene, por lo general, un ácido 6-amino-penicilánico de una pureza comprendida entre 70% y 95%. El producto puro ha de obtenerse por recrystalización, operando del siguiente modo: el producto a purificar se suspende en agua; luego se disuelve mediante ajuste del pH con un valor alrededor de 7, por medio de un agente alcalino (sosa, potasa, amoníaco); la solución se filtra; la cristalización del ácido 6-amino-penicilánico se obtiene por acidificación a pH entre 3 y 5, mediante un ácido mineral u orgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico o ácido acético⁵⁴¹.

2.2.7.b. Amino penicilinas

En fecha relativamente temprana, concretamente el 2 de octubre de 1959, la entidad inglesa *Beecham Laboratories Ltd*^{ed} presentó a registro una solicitud de patente

⁵⁴¹ Los autores completan la memoria con una serie de ejemplos prácticos; el primero de ellos, el más significativo, es como sigue: se opera con 425 l. de mosto de fermentación a un pH de 6,3; se filtran después de la adición de un coadyuvante de filtración; la torta de filtración (que se encuentra a una temperatura de 23° C), se lava con agua; se obtiene 440 l. de filtrado que contienen 445 mg./l. de ácido 6-amino-penicilánico. Al filtrado se le añaden 2,1 kg. de aldehído salicílico disuelto en 6 l. de acetona; la mezcla se agita 30 minutos; se enfría a 1° C. La extracción de la imina obtenida se realiza en una instalación adecuada que comprende un grupo de emulsores-decantadores centrífugos, con dos pisos montados para funcionar a contracorriente; el conjunto se utiliza a los caudales siguientes: solución acuosa conteniendo imina: 200 l./hora, acetato de etilo: 80 l./hora; solución acuosa de ácido sulfúrico 2 N, en cantidad que permita obtener un pH de 2,5. Se recogen, después de la extracción, 160 l. de extracto de acetato de etilo que se clarifican por filtración sobre un lecho de coadyuvante de filtración. Con este extracto se opera como se indica a continuación: el extracto se concentra, a presión reducida, en un concentrador de reciclado continuo, a una temperatura que no exceda de 20° C, su volumen alcanza un valor de 10 l.; al concentrado se le añaden 2,5 l. de agua; la mezcla se agita y su pH se ajusta a 7 con una solución de amoníaco 2 N; se agita durante 15 minutos y se deja en reposo; la capa acuosa se separa; la capa orgánica se extrae, de nuevo, con 2 l. y, después, con 1,5 l. de agua, a pH 7; los extractos acuosos se unen; a la solución resultante se le añade, bajo agitación, 1,5 l. de solución acuosa al 10% de acetato de dibencil-etilén-diamina. El precipitado obtenido se orea, se lava con agua y se seca al vacío; se han obtenido 370 g. de sal de dibencil-etileno-diamina de la imina salicílica del ácido 6-amino-penicilánico bruto, que encierra 121 g. de ácido 6-amino-penicilánico puro (corresponde a una proporción del 60% de sal de imina). Se procesa la dibencil-etilén-diamina de la imina según el siguiente protocolo: 200 g. de la sal bruta, procedente de dibencil-etilén-diamina de la imina, se suspenden en 1 l. de agua; la suspensión se enfría a 0° C mediante un baño de hielo; se añaden 1,21 l. de metil-isobutil-carbinol; se acidifica a pH 1,5 con 0,45 l. de solución de ácido clorhídrico 3 N; se agita durante 10 minutos y luego se filtra el producto insoluble (48 g. de producto inactivo); las dos fases se separan, la fase acuosa se lava con 0,9 l. de metil-isobutil-carbinol, se ajusta el pH a 3,3 con 0,3 l. de amoníaco a 2,5 N; se ha obtenido una primera fracción de ácido 6-amino-penicilánico cristalizado que, después de 15 minutos, se orea, se lava con agua y se seca en vacío; esta primera fracción representa 60 g. de ácido 6-amino-penicilánico a 89% de pureza. Con las dos soluciones de metil-isobutil-carbinol se procede como se indica: ambas soluciones se unen; se extraen dos veces con 0,45 l. de agua a pH 1,5; las soluciones acuosas se unen a las aguas madre de cristalización y la mezcla obtenida se neutraliza a pH 6 mediante una solución de amoníaco 2,54 N; después se concentra a presión reducida, a 0,28 l.; el concentrado se filtra y acidifica a pH 3,3 mediante una solución de ácido clorhídrico 3 N; se ha obtenido una segunda fracción de la que, después de orear, lavar y secar, se obtienen 12 g. de ácido 6-amino-penicilánico, con una pureza del 44%. Las dos fracciones reunidas se recrystalizan juntas; con la mezcla obtenida se opera así: la mezcla se disuelve en 0,15 l. de agua destilada; se ajusta el pH con 0,08 l. de amoníaco 2,5 N; la solución se filtra y después se lava con 0,05 l. de alcohol n-butílico; la fase acuosa se acidifica a pH 3,3 con 0,07 l. de ácido clorhídrico 3 N y se agita lentamente durante 30 minutos. El ácido 6-amino-penicilánico que ha recrystalizado se orea, lava y seca; se obtienen 54,4 g. de ácido.

de invención, por un período de veinte años, para un “Proceso para la preparación de derivados penicilínicos de fórmula general



»⁵⁴²; figuran como inventores Frank Peter Doyle, John-Herbert-Charles Naylor y Harry Smith, todos de nacionalidad británica⁵⁴³.

El procedimiento se relaciona con los derivados del ácido 6-amino-penicilánico obtenidos mediante la introducción de grupos aminoácidos en el grupo amino del ácido 6-amino-penicilánico. El grupo acilo-amino introducido puede contener hasta 20 átomos de carbono; esta cadena de carbonos puede sustituirse con más grupos amino y hasta es posible hallarse parte como sistema de anillos alicíclicos, aromáticos o heterocíclicos⁵⁴⁴. Según los autores de la patente, los compuestos obtenidos son útiles como agentes microbianos para el tratamiento de la mastitis en el ganado y como agentes terapéuticos en aves y otros animales, incluido el hombre, especialmente en el caso de enfermedades bacterianas, tanto gram-positivas como gram-negativas. Los productos obtenidos son sales metálicas: sódica, potásica, cálcica, aluminica y sus sales amónicas, por ejemplo sales con procaína y otras aminas que se han usado para formar sales con la bencil-penicilina.

Los derivados amino-acilos protegidos por esta patente pueden prepararse haciendo reaccionar ácido 6-amino-penicilánico con un anhidro obtenido mediante la reacción del ácido carboxílico amino-sustituido, o una sal del mismo, que tenga su grupo amino con un éster de ácido cloro-carbónico. Otro método posible es usar los procedimientos ordinarios empleados en la síntesis de los péptidos, entre los que están incluidos el uso de una azida de ácido reactivo o un reactivo carbodiimida⁵⁴⁵.

⁵⁴² AHOEPM, patente 252.422; la memoria descriptiva queda firmada, en Madrid, a 2 de octubre de 1959; como domicilio social de la empresa figura Brockham Park, Betchworth, Surrey (Inglaterra). La patente tiene prioridad británica bajo registros 31847/58 [6-X-1958] y 16303/59 [12-V-1959]. La patente española fue concedida el 2-XI-1959 y hecha pública el 1-I-1960.

⁵⁴³ Frank Peter Doyle y John Herbert Charles Naylor recibieron en 1971, junto a Frank Ralph Batchelor y George Newbolt Rolinson, el premio ‘The Mullard Award’ entregado por la *Royal Society*. “in recognition of their contributions to the development of the semisynthetic penicillins” [<http://royalsociety.org/awards/mullard-award/>].

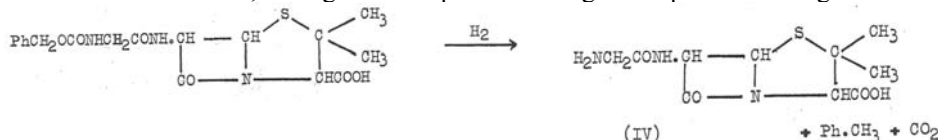
⁵⁴⁴ Cuando la cadena de carbonos es sustituida por dos grupos amino o un grupo amino en la posición alfa, puede contener también un grupo carboxilo. Los autores de la patente señalan cinco ejemplos: a) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ [n es un número entero de 1 a 20]; b) $\text{R}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}-$ [n es cero o un número entero de 1 a 6 y R es hidrógeno o un grupo alquilo, arilo, aralquilo o heterocíclico, que puede ser también sustituido]; en este grupo se pueden incluir también derivados de los aminoácidos alanina, valina, norvalina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, treonina, histidina, asparagina y glutamina; c) $\text{HOOC.CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_n\text{Co}-$ y $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}-$; este grupo incluye derivados del ácido aspártico, ácido glutámico y alfa-amino-adípico; d) $\text{HN}_2(\text{CH}_2)_n(\text{N}_2\text{H})\text{CO}-$ [n es un entero de 1 a 4], este grupo incluye derivados de lisina y ornitina; e) $\text{HOOC.CH}(\text{N}_2\text{H})(\text{C}_2\text{H}_n)\text{CH}_2(\text{NH})\text{CO}-$ [n es cero o un entero de 1 a 3], este grupo incluye derivados del ácido alfa- delta-diamino adípico y del ácido alfa-épsilon-diamino-pimélico. La mayoría de los compuestos mencionados tienen, al menos, un átomo de carbón asimétrico, por lo que pueden existir en forma D- y mezcla DL-; si el derivado contiene dos átomos de carbono asimétricos habrá cuatro isómeros y dos mezclas DL.

⁵⁴⁵ En la memoria se recoge una referencia al trabajo de John C. SHEEHAN, George P. Hess. “New method of forming peptide bonds”. *Journal of the American Chemical Society*, 77(4): 1067-1068. Washington DC, 1955.

La separación del grupo o grupos protectores para formar la penicilina amino-sustituída se efectúa dejando que el derivado amino-acilo reaccione con hidrógeno en presencia de un catalizador. El proceso se realiza a temperatura ambiente y a la presión atmosférica, siendo el pH de la mezcla reactiva de 5 a 9. El disolvente para efectuar la reacción de hidrogenación es agua. El catalizador usado preferentemente es paladio. Dado que algunas sustancias antibióticas obtenidas por este proceso son relativamente inestables, es necesario operar en condiciones de reacción y aislamiento que sean moderadas⁵⁴⁶.

Sobre este procedimiento, el 5 de junio de 1961, la misma empresa, la británica *Beecham Research Laboratories Limited*, presentó un expediente para solicitar un certificado de adición a un "Proceso para preparación de derivados penicilínicos", ya patentado en España bajo registro 252.422⁵⁴⁷; como en el caso de la patente principal,

⁵⁴⁶ En la memoria de la patente se recogen 19 ejemplos que ocupan la mayor parte de este documento; nos ocupamos del primero de ellos: preparación de amino-metil-penicilina: una suspensión de paladio sobre carbonato bárico (7,3 g. del 30%) en agua (200 ml.) se agitó, durante dos horas, en una atmósfera de hidrógeno a la temperatura ambiente y a presión atmosférica; terminado el tratamiento, se retiró el catalizador y se lavó con agua, cuidando que nunca se secase. La sal sódica de carbo-bencil-oxi-amino-metil-penicilina (4,5 g. de un material de una pureza del 40%), se añadió a la suspensión acuosa del catalizador previamente tratado y se ajustó el pH a 8,0 con una solución (3%) de bicarbonato de sodio. La mezcla se agitó, bajo una atmósfera de hidrógeno, a la temperatura ambiente y a presión atmosférica durante 45 minutos. Se añadió una segunda cantidad de paladio en carbonato de bario (7,3 g. del 30%), previamente reducida y se continuó la hidrogenación durante otros 45 minutos. Se filtró el catalizador, se lavó con agua y, después de ajustar el pH del filtrado a 7,0 con ácido clorhídrico 1 N, se evaporó hasta dejarlo seco, bajo una presión reducida y a una temperatura inferior a 20° C. Se obtuvo amino-metil-penicilina, en forma de polvo almarillo (3,0 g.) de una pureza probada del 33%. La cromatografía en papel mostró que este material contenía solamente un antibiótico de un valor considerablemente diferente al del material inicial; el producto demostró ser estable en solución ácida e inhibir *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1,25 mcg/ml. La representación gráfica queda como sigue:

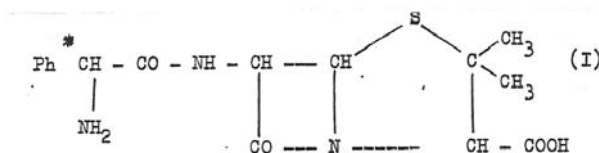


La sal sódica de la carbo-bencil-oxi-amino-metil-penicilina fue preparada como se indica a continuación: se añadió, gota a gota, clorocarbonato de etilo (1,9 ml.) a una solución de N-carbo-bencil-oxiglicina (4,5 g.) y trimetil-amina (3 ml.) en acetona seca (170 ml.), enfriada con hielo y agitada; después de 5 minutos, la suspensión resultante fue tratada, lentamente, con una solución enfriada con hielo del ácido 6-amino-penicilánico (4,3 g.) en bicarbonato sódico acuoso al 3% (170 ml.); durante la adición se mantuvo la mezcla a 0° C pero luego se dejó que se calentase a la temperatura ambiente, durante otra hora de agitación. La mezcla se lavó con éter tres veces, usando cada vez un volumen de éter de 250 ml.; se separaron los materiales procedentes del lavado. La fase acuosa fue tratada con ácido clorhídrico hasta conseguir un pH de 2 y el ácido penicilínico libre fue extractado con butanol (primeramente 40 ml. y luego dos veces con 10 ml. cada una). La sal sódica de la carbo-bencil-oxi-amino-metil-penicilina fue recuperada volviendo a extraer la solución lavada de butanol con agua (tres veces, de 5 ml. cada una); a cada porción se le añadió suficiente bicarbonato sódico acuoso al 3% para llevar la fase acuosa a un pH 7. Los extractos acuosos combinados fueron lavados con éter y luego evaporados a menos de 20° C al vacío, obteniéndose así la sal sódica sólida (4,7 g.).

⁵⁴⁷ AHOEPM, patente 267.993; la memoria descriptiva consta de diez páginas mecanografiadas, queda firmada, en Madrid, a 5 de junio de 1961; como domicilio social de la empresa figura Great West Road, en Brentford (Middlesex, Inglaterra). La patente tiene prioridad británica, bajo registro 29345/60, concedida el 25-VIII-1960. La patente española fue aprobada el 12-VII-1961 y hecha pública el 16-X-1961.

figuran como inventores del procedimiento Frank Peter Doyle, John-Herbert-Charles Nayler y Harry Smith, todos de nacionalidad británica.

Ya en la patente principal, los autores reivindicaron una serie de derivados penicilínicos, con notable actividad antibiótica, cuyos compuestos pueden obtenerse introduciendo grupos sustitutivos amino-acilos en el grupo amino del ácido 6-amino-penicilánico. Uno de tales compuestos es la alfa-amino-bencil-penicilina, cuya fórmula estructural está indicada bajo estas líneas:



En la fórmula se observa la existencia de un átomo de carbono asimétrico (marcado con un asterisco) en la cadena lateral de este compuesto, por lo que pueden formarse dos formas isómeras ópticamente activas. Estas formas isómeras son epímeros y no enantiomorfos por el hecho de que el ácido 6-amino-penicilánico usado en la síntesis es, en sí mismo, un compuesto ópticamente activo.

El ácido alfa-amino-fenil-acético empleado para la fabricación de alfa-amino-bencil-penicilina es la forma DL ópticamente inactiva, obteniéndose así una penicilina final mezcla de los dos epímeros. El aislamiento, purificación y ensayo de tal producto presenta serios problemas y, comercialmente, el producto no es apropiado en el sentido de que su composición puede variar entre carga y carga.

Para solventar esta situación, los autores han descompuesto el ácido DL-alfa-amino-fenil-acético y preparado las dos formas epímeras de la alfa-amino-bencil-penicilina: ácido 6-[D(-)-alfa-amino-fenil-acetamido]-penicilánico y ácido 6-[L(+)-alfa-amino-fenil-acetamido]-penicilánico⁵⁴⁸. Las dos formas separadas de alfa-amino-bencil-penicilina fueron aisladas y obtenidas analíticamente puras. El ácido 6-[D(-)-alfa-amino-fenil-acetamido]-penicilánico ha resultado ser mas soluble en agua en su punto isoeléctrico y más activo contra varias clases de bacterias *in vitro* que el ácido 6-[L(+)-alfa-aminofenilacético]-penicilánico. Los autores ilustran su invención con media decena de ejemplos⁵⁴⁹.

⁵⁴⁸ El ácido DL-alfa-amino-fenil-acético fue sintetizado siguiendo los procedimientos descritos por Mario BETTI, Mario MAYER. "Optische Spaltung der α -Amino-phenyl-essigsäure". *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 41: 2071-2073. Berlin, 1908 y A. W. INGERSOLL. "A method for the complete, mutual resolution of inactive acids and bases". *Journal of the American Chemical Society*, 47(4): 1168-1173. Washington DC, 1925. Los dos epímeros fueron preparados con las formas dextrógira y levógira del ácido, según el método descrito en la patente española 252.422. A través de toda la reacción se emplearon condiciones suaves, a fin de evitar la racemización.

⁵⁴⁹ Nos ocupamos sólo del primero de ellos, relativo a la preparación del ácido 6-[D(-)-alfa-amino-fenil-acetamido]-penicilánico, mediante la acción del cloro-carbonato de bencilo, sobre una solución helada de ácido D(-)-alfa-amino-fenil-acético en un equivalente de hidróxido sódico acuoso 1 N, añadiéndose más hidróxido sódico acuoso al avanzar la reacción a fin de mantener el pH entre 8 y 9. Una cantidad de 4,8 ml. de clorocarbonato de etilo se añadió a una solución helada del anterior carbo-bencil-óxido (14,3 g.) y trietil-amina (8,3 ml.) en acetona seca (420 ml.); la mezcla se agitó a 0° C durante 5 minutos. Precipitó hidrocloreuro de trietil-amina y se formó el correspondiente anhídrido mixto en solución. Se enfrió la solución a -50° C [*sic* por -5° C?]; se agitó vigorosamente, añadiéndole una solución helada de ácido 6-amino-penicilánico (13 g.) en bicarbonato sódico acuoso al 3% (420 ml.), manteniendo la temperatura de la mezcla siempre por debajo de 0° C. Se formó una solución que fue agitada durante 30 minutos a 0° C y, luego, otros 30 minutos mientras alcanzaba la temperatura ambiente; finalmente se extrajo con éter (3 x 4.000 ml.), reteniéndose solo la fase acuosa. Esta solución acuosa se lleva a pH 2

El 16 de marzo de 1962 es una empresa norteamericana, *Bristol-Myers Company*, quien presenta ante el registro español de patentes su solicitud para proteger, por veinte años, un “Procedimiento de preparación de alfa-amino-bencil-penicilinas sustituidas o no sustituidas”⁵⁵⁰. Como responsables del procedimiento figuran Ivon Gaston Perrson⁵⁵¹ y William F. Minor.

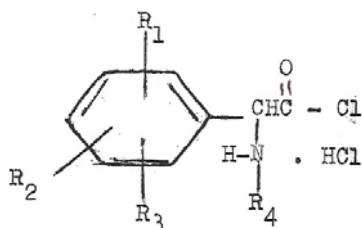
La fabricación de alfa-amino-bencil-penicilina incluye la preparación de ácido alfa-amino-fenil-acético, de manera que se proteja al grupo amino, por ejemplo con cloruro de benzoxi-carbonilo, para formar un ácido alfa-carbo-benzoxi-amino-fenil-acético; la reacción del anhídrido de este compuesto con ácido 6-amino-penicilánico, la subsiguiente separación del protector del grupo amino mediante hidrogenolisis y, finalmente, la purificación del producto. Este método ha resultado muy difícil de llevar a la práctica comercial y, además, tiene la desventaja de ser muy costoso, particularmente en la operación de hidrogenolisis, que requiere grandes cantidades de catalizador de hidrogenación. La intención de los autores es proporcionar un método, comercialmente útil, mediante el cual pueda reaccionar el ácido 6-amino-penicilánico con cloruro de 2-fenilglicilo-hidrocloruro para producir alfa-amino-bencil-penicilina y cualquiera de los diastereoisómeros de la misma, sustancialmente libres de contaminantes, con un mínimo de operaciones.

por medio de la adición de ácido clorhídrico; se forma el ácido 6-[D(-)-alfa-(carbo-bencil-oxi-amino)-fenil-acetamido]-penicilánico, que fue extractado con éter (150 ml. en 3 porciones). La purificación parcial de este producto intermedio se efectuó volviendo a extraer en bicarbonato sódico acuoso como la sal sódica y luego llevado a un pH 2, de nuevo con éter como ácido libre. Finalmente, se volvió a convertir en la sal sódica, agitando la solución de éter con suficiente bicarbonato sódico al 3% para dar una fase acuosa neutra, separando esta última y evaporando a temperatura y presiones bajas. El producto fue secado finalmente sobre pentóxido de sodio al vacío para originar 6-[D(-)-alfa-(carbo-bencil-oxi-amino)-fenil-acetamido]-penicilinato sódico moderadamente puro (13 g.), que mostró una sola actividad antibiótica sobre un cromatograma de papel. Se agitó una suspensión de paladio sobre carbonato bórico (38 g. al 38%) en agua (125 ml.) en una atmósfera de hidrógeno a la temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se añadió una solución neutra de 6-[D(-)-alfa-carbo-bencil-oxi-amino-(fenil-acetamido)-penicilinato sódico (20,4 g.) en agua (250 ml.) y se reanudó la agitación en hidrógeno durante otra hora. Se filtró la suspensión y se trataron el filtrado y lavados acuosos combinados con ácido N-clorhídrico a un pH 2, lavándose luego con éter (3 x 100 ml.). Se ajustó la fase acuosa a un pH 4,65 por medio de una solución de bicarbonato sódico al 3% y luego se concentró, a temperatura y presión bajas, a un volumen de ca. 50 ml., tras lo cual se separaron unas agujas finísimas e incoloras. Al cabo de 30 minutos se recogieron los cristales, se lavaron con un poco de agua fría y se secaron sobre pentóxido de fósforo al vacío par originar ácido 6-[D(-)-alfa-amino-fenil-acetamido]-penicilánico mono-hidratado (5,5 g.) puro, con descomposición en agua a ca. 202° C. Una posterior cristalización con agua no cambió la rotación óptica. Se determinó la composición centesimal del producto obtenido y del compuesto, de fórmula empírica $C_{16}H_{10}N_3O_4S \cdot H_2O$; los porcentajes obtenidos son: C (52%), H (5,7%), N (11,9%) y S (8,9%); mientras los teóricos para $C_{16}H_{10}N_3O_4S \cdot H_2O$ serían: C (52,3%), H (5,8%), N (11,4%) y S (8,9 %). Se obtuvieron otros 9 g. de producto menos puro concentrando el filtrado acuoso; como la primera producción, proporcionó solamente una zona de actividad antibiótica sobre un cromatograma de papel, que fue diferente del formado por el producto intermedio carbo-bencil-óxido sin reducir.

⁵⁵⁰ AHOEPM, patente 275.555; la memoria descriptiva consta de trece páginas mecanografiadas, firmadas en Madrid, a 16-III-1962; el texto se corresponde con el la patente estadounidense 97.768, concedida el 23 marzo de 1961. La empresa tiene fijado su domicilio en Thompson Road, East Syracuse (Nueva York. EE. UU.). La patente española fue concedida el 28-III-1962 y publicada el 16-V-1962.

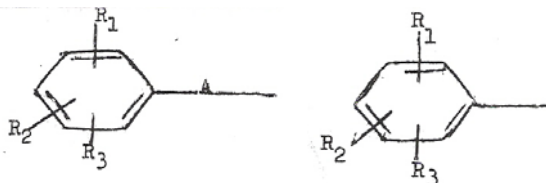
⁵⁵¹ Este investigador, de origen canadiense, figura el 2 de octubre de 1961 como vinculado a la empresa inglesa *Beecham Research Laboratories Limited* (cf. AHOEPM, patente 270.875). Es posible que, entre ambas empresas, existiera algún tipo de vinculación.

El método comprende la puesta en contacto de un compuesto seleccionado, la sal hidrocioruro de un cloruro de glicilo sustituido, del grupo de compuestos de fórmula general:



R_1 , R_2 y R_3 son, cada uno de ellos, hidrógeno, nitro, di-(inferior)-alquilamino, acilamino, alquilo (inferior), flúor, cloro, bromo, yodo, alcóxido (inferior), hidróxido, alquiltio (inferior), alquil-sulfonilo, sulfamilo, bencilo, fenetilo, ciclo-heptilo, ciclo-hexilo, ciclo-pentilo o trifluoro-metilo⁵⁵².

R_4 es hidrógeno, alquilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o radicales de las fórmulas generales



donde R_1 , R_2 y R_3 tienen el significado indicado arriba.

A es un grupo alquileo divalente saturado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono inclusive.

Este procedimiento es también efectivo si, en lugar de la sal de una amina terciaria del ácido 6-amino-penicilánico, se emplea una mezcla de ácido 6-amino-penicilánico y una cantidad de amina terciaria estequiométricamente equivalente al reactivo del cloruro ácido⁵⁵³. Cada una de las penicilinas preparadas mediante este procedimiento puede convertirse fácilmente en sus sales ácidas carboxílicas⁵⁵⁴.

La temperatura a la que se desarrolla el proceso puede variar ampliamente, con unos límites de -40° y $+40^{\circ}$ C; no obstante, conviene realizar la reacción a 0° C. El período de reacción puede variar también entre 1 a 120 minutos; un tiempo adecuado es de 1 a 30 minutos. El medio de reacción empleado en este proceso es esencialmente no acuoso; ente los disolventes útiles figuran los orgánicos no acuosos que no reaccionan con la sal amina terciaria del ácido 6-amino-penicilánico ni con el reactivo acilador⁵⁵⁵.

⁵⁵² El termino 'alquilo' se usa aquí para referirse a grupos hidrocarburos alifáticos saturados de cadena recta y/o ramificada que tienen de 1 a 20 átomos de carbono; por ejemplo: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, arilo, hexilo, laurilo, octadecilo, tetradecilo, hexadecilo y otros. La expresión grupos 'alquilo (inferior)' se refiere a grupos alquilos que tienen de 1 a 6 átomos de carbono.

⁵⁵³ Entre las sales aminas terciarias del ácido 6-amino-penicilánico utilizadas en este procedimiento figuran las formadas con tri-(inferior)-alquil-aminas, por ejemplo tri-etil-amina o tri-metil-amina, o con N-dietil-piperidina, 2,6-lutidina, piridina, N-metil-pirrolidona o di-metil-piperazina. La amina terciaria de empleo recomendado es la tri-metil-amina.

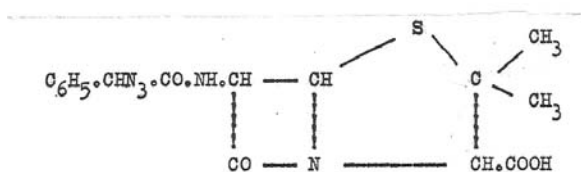
⁵⁵⁴ Por ejemplo, sus sales metálicas atóxicas, tales como las sales sódicas, potásicas, cálcicas, aluminicas y amónicas y sus sales amónicas sustituidas atóxicas, con una amina del grupo de la trialquil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N'-dibencil-etileno-diamina, dehidro-abietil-amina, N,N'-bis-dehidro-abietileno-diamina y N-(inferior)-alquil-piperidina, por ejemplo N-etil-piperidina.

⁵⁵⁵ Por ejemplo, hidrocarburos halogenados, dicloruro de metileno (el disolvente de elección), tetracloruro de carbono, cloroformo, aceto-nitrilo, tetra-hidro-furano y los disolventes orgánicos líquidos no acuosos oxigenados que no obstaculizan las reacciones de acilación, por ejemplo dioxanos, dimetil-formamida (DMF), dimetil-acetamida (DMAC), acetona, formamida o ácido acético.

Los autores proponen nueve ejemplos que ilustran el proceso de preparación de algunos de los productos obtenidos por este procedimiento: preparación de cloruro de 2-fenil-glicilo-hidro-cloruro⁵⁵⁶ y, especialmente, de la DL-alfa-amino-bencil-penicilina.

El 7 de julio de 1962, la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* presentó, ante el registro de patentes, un expediente para proteger un "Procedimiento de preparación de alfa-amino-bencil-penicilina"⁵⁵⁷; pese al marchamo inglés con el que se presenta la empresa, el procedimiento objeto de patente está desarrollado por dos investigadores suecos: Berndt Olof Harald Sjöberg y Bertil Ake Ekstrom.

Este procedimiento permite la preparación de una alfa-amino-penicilina, o una sal atóxica de ella, a través de la hidrogenación catalítica de alfa-azido-bencil-penicilina de fórmula general



o de una de sus sales atóxicas⁵⁵⁸.

La hidrogenación catalítica se lleva a cabo con la alfa-azido-bencil-penicilina en un disolvente adecuado o una sal de alfa-azido-penicilina en agua u otro disolvente, siendo preferidas para la reacción la temperatura ambiente y, por lo menos, la presión atmosférica. El catalizador empleado es níquel ('níquel Raney'), pero también son útiles otros catalizadores tales como paladio, platino o rodio; los catalizadores pueden ir sustentados por un carbonato metálico alcalinotérreo. La penicilina obtenida contiene, por lo menos, un átomo de carbono asimétrico y existirá en las formas D- y L- y en sus mezcla DL-.

⁵⁵⁶ Nos centramos en este caso, que presenta dos pruebas. Prueba I: se suspende D(-)-2-fenil-glicina (25,0 g., 0,165 moles D/[alfa] = -153°) en 500 ml. de dicloruro de metileno y se añade pentacloruro de fósforo (63,0 g., 0,3° moles) a la suspensión, a 3° C; pasados 10 minutos, se añaden 2 ml. de dimetil-formamida a la mezcla de reacción, que se agita luego durante 10 minutos en un baño de hielo y seguidamente, durante 2 horas, a la temperatura ambiente; se ha formado cloruro de 2-fenil-glicilo hidrocloreto, que se recogió por filtración, se lavó con dicloruro de metileno y éter, se secó al vacío sobre P₂O₅ durante dos horas, pesó 19,6 g. Prueba II: se enfría a 0° C una suspensión de DL-2-fenil-glicina (10,0 g., 0,066 moles) en 40 ml. de tetracloreto de carbono y se añade pentacloruro de fósforo (15,0 g., 0,072 moles); se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas; luego se recogió por filtración el producto y se secó al vacío sobre P₂O₅ durante 3 horas, dando un peso de 11,2 g. (82% de producción teórica); el análisis infrarrojo muestra que el producto es esencialmente el deseado con alguna contaminación, que parece ser de 2-fenil-glicina.

⁵⁵⁷ AHOEPM, patente 279.025; la memoria descriptiva consta de siete páginas mecanografiadas, firmadas en Madrid, a 7 de julio de 1962; el expediente se basa en las solicitudes de patente británica 26.488/61 y 26.489/61, ambas del 21 de julio de 1961. Como domicilio social de la empresa figura Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente española fue concedida el 24-IX-1962 y hecha pública el 1-XI-1962.

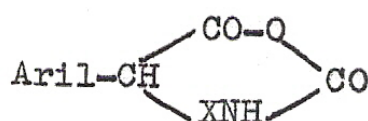
⁵⁵⁸ Estas sales atóxicas incluyen sales metálicas tales como sódicas, potásicas, cálcicas y aluminicas, la sal amónica y las sales amónicas sustituidas, por ejemplo sales de aminas atóxicas tales como las tri-alquil-aminas, del tipo de la tri-etil-amina, procaína, di-bencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N'-di-bencil-etilén-diamina, dehidro-abietil-amina, N,N'-bis-dehidro-abietil-etilén-diamina y otras aminas que se han usado para formar sales con bencil-penicilina.

La alfa-azido-bencil-penicilina, usada como material inicial, se prepara haciendo reaccionar ácido 6-amino-penicilánico, o sal neutra del mismo, con un compuesto de fórmula general $C_6H_5-CHN_3-CO-Y$, en la que Y es un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo NH_2 del ácido 6-amino-penicilánico, para formar $-CO-NH$. Como variante, la acilación puede llevarse a cabo usando un reactivo carbodiimida.

El procedimiento se inicia con ácido 6-amino-penicilánico, bajo condiciones anhidras, en un disolvente orgánico inerte, o con el licor de fermentación obtenido mediante el cultivo de un moho en un medio nutritivo, con o sin la subsiguiente purificación parcial, siempre que contenga ácido 6-amino-penicilánico. Las soluciones con ácido 6-amino-penicilánico formado por desdoblamiento enzimático de penicilina G, por ejemplo, pueden emplearse en este procedimiento. Los productos obtenidos de acuerdo con este método se aíslan y purifican por las técnicas conocidas que se emplean con otras penicilinas.

Los autores explican, mediante casos prácticos, procedimientos para elaborar: alfa-azido-bencil-penicilina, a través del anhídrido mezclado⁵⁵⁹; alfa-azido-bencil-penicilina, a través del cloruro ácido y alfa-amino-bencil-penicilina.

El 13 de septiembre de 1962 es una empresa italiana, *Lepetit S.p.A.*, quien presenta ante el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, un "Procedimiento de preparación de penicilina"⁵⁶⁰, consistente en hacer reaccionar una sal de metal alcalino de ácido 6-amino-penicilánico con un anhidro de fórmula general

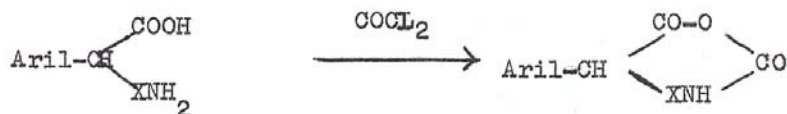


X representa un oxígeno, alquileo o nada.

⁵⁵⁹ A modo de ejemplo, nos ocupamos de este primer caso, la preparación de alfa-azido-bencil-penicilina, a través del anhídrido mezclado: se agitó y se enfrió por debajo de $-5^\circ C$, una solución de ácido alfa-azido-fenil-acético (8,9 g., 0,05 moles) y trietilamina (5,1 g., 0,05 moles) en 50 ml. de dimetil-formamida seca; manteniendo a esta temperatura la solución, se le añadió cloroformato etílico (4,7 ml.) en porciones, de manera que la temperatura no subiese por encima de $-5^\circ C$. Después de que se hubo agitado la mezcla durante 20 minutos, se añadió en una porción acetona seca (100 ml.), enfriada a $-5^\circ C$, seguida inmediatamente de una solución helada de ácido 6-amino-penicilánico (10,8 g., 0,05 moles) y trietilamina (5,1 g.; 0,05 moles) en 100 ml. de agua, continuándose la agitación durante hora y media a $0^\circ C$; se ajustó el pH de la solución en 7,5 mediante la adición de una solución saturada de bicarbonato sódico. Después de lavarse dos veces con éter dietílico, se acidificó la solución de la reacción a un pH 2 con ácido clorhídrico diluido; se obtuvo la sal potásica de alfa-azido-fenil-penicilina como polvo ligeramente coloreado (11,2 g.), con un rendimiento 54% del teórico. La pureza del producto era del 55%, determinada por el método de la hidroxilamina (usándose la sal potásica de la penicilina G como patrón); el espectro infrarrojo de esta sustancia mostró la presencia de un grupo azido y de un grupo betaláctamico. La sustancia inhibió el desarrollo del *Staphylococcus aureus* Oxford a una concentración de 0,25 mcg./ml.

⁵⁶⁰ AHOEPM, patente 280.753; la memoria descriptiva, compuesta de doce hojas escritas a máquina por una sola cara, queda firmada, en Madrid, el 13 de septiembre de 1962. El expediente se corresponde con los presentados ante la Administración británica como registros 34.459/61 [26-IX-1961] y 4.892/62 [8-II-1962]. La empresa figura como domiciliada en *viale Abruzzi*, 94, Milan (Italia). La patente española le fue concedida el 24-XI-1962 y hecha publica el 1-II-1963.

en una mezcla de agua y un disolvente orgánico soluble en agua e inerte, tal como la acetona. El anhídrido se obtiene tratando el aminoácido elegido con fosgeno, como se indica en la fórmula



El procedimiento es aplicable en todos los casos en los que el grupo amino del ácido 6-amino-penicilánico ha de acilarse con un grupo acilo derivado de un ácido carboxílico que, a su vez, posee un grupo amino libre.

Para llevar a cabo el procedimiento es preciso que el aminoácido elegido sea suspendido en un disolvente orgánico anhidro o inerte, como dioxano, tetra-hidro-furano o tolueno. En la solución se hace borbotear fosgeno hasta obtenerse una disolución completa; después de evaporar el disolvente, se produce el anhídrido adecuado. Una solución de este anhídrido en un disolvente inerte, miscible en agua, se pone en contacto con una solución acuosa de una cantidad equivalente de una sal de metal alcalino del ácido 6-amino-penicilánico, a una temperatura no superior a unos 20° C; a continuación se evapora el disolvente y del residuo se extrae la penicilina formada, mediante los procedimientos convencionales⁵⁶¹.

Este mecanismo puede aplicarse a cualquier tipo de penicilina, pero son de especial interés para los autores la beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina y la gamma-amino-alfa-fenil-propil-penicilina; ambas sustancias poseen un átomo de carbono asimétrico y sus correspondientes diastereoisómeros se preparan por métodos conocidos⁵⁶². En la memoria se proporcionan datos sobre la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de algunas de estas penicilinas, contra distintos microorganismos patógenos⁵⁶³.

Los autores señalan el grado elevado de resistencia de estas nuevas penicilinas frente a los ácidos y 'penase' (una beta-lactamasa), a la par que su resistencia al ácido

⁵⁶¹ Así, por ejemplo, después de acidular la mezcla de reacción con un ácido mineral, de la filtración de algunos subproductos -si es que se han formado- y de evaporar a sequedad, en el vacío, la parte inorgánica puede separarse por filtración después de disolver el residuo en un disolvente en el que la penicilina sea soluble. Cuando estos procesos de purificación lleven a una solución de la penicilina en un disolvente, la separación de éste, por destilación, proporcionará la penicilina como residuo; en otros casos, será preferible aislar la penicilina en forma de sal de metal alcalino. Al final de la reacción de acilación, el producto soluble en agua (la sal de metal alcalino de la penicilina), se separa por filtración de la parte insoluble y el producto se aísla de la solución por evaporación o secado por congelación.

⁵⁶² Las formas ópticamente activas de la beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina se obtienen partiendo de ácidos alfa-fenil-beta-carbo-benzoxi-amino-propiónicos, ópticamente activos, preparados partiendo del racemato a través de su sal con bases ópticamente activas, tales como quinina, estricnina, cinconina y morfina.

⁵⁶³ Los autores analizan la acción de DL-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina, D-(-)-beta-amino-alfa-penicilina y DL-gamma-alfa-amino-alfa-fenil-propil-penicilina frente a diversas cepas de *Staphylococcus pyogenes-aureus*, *Staphylococcus faecalis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella schott-muellari*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*.

clorhídrico (pH=1) en comparación con la fenoxi-etil-penicilina, una de las penicilinas menos sensibles a los medios ácidos⁵⁶⁴.

El 17 de enero de 1963 la empresa norteamericana *Bristol-Myers Company* presentó, ante el registro español, una patente de invención, por veinte años, destinada a proteger “Un procedimiento para la producción de una alfa-amino-bencil-penicilina”⁵⁶⁵.

Los inventores de este método, David A. Johnson, estadounidense y Saul Wolf, canadiense, presentan un sistema perfeccionado de la obtención de la alfa-amino-aril-metil-penicilina, que comprende la reacción de ácido 6-amino-penicilánico con un hidrocloreto de cloruro 2-amino-2-aril-acetilo⁵⁶⁶ o con hidrocloreto de cloruro 2-fenil-glicílico, para producir alfa-amino-bencil-penicilina y cualquiera de sus estereoisómeros⁵⁶⁷.

El procedimiento comprende: mezcla de 1,0 a 3,0 moles de un hidrocloreto de cloruro 2-fenil-glicílico, de fórmula general indicada bajo estas líneas, por mol de ácido

⁵⁶⁴ Los autores proponen unos ejemplos de sus procedimientos; entre ellos los destinados a la formación de DL-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina, (+)-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina, (-)-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina, DL-alfa-amino-bencil-penicilina, D-(-)-alfa-amino-bencil-penicilina, alfa-amino-bencil-penicilina, alfa-fenil-gamma-amino-propil-penicilina y alfa-fenil-delta-amino-butil-penicilina.

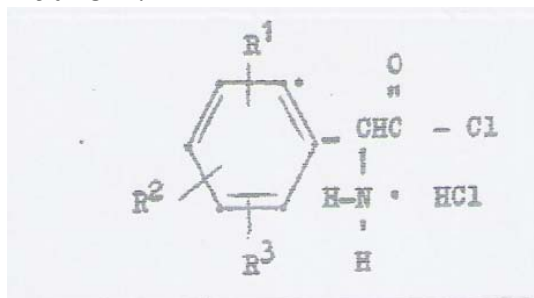
A modo ilustrativo, nos ocupamos de la formación de DL-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina: en una suspensión de 5 g. de ácido DL-beta-amino-alfa-fenil-propiónico en 100 cm³ de dioxano, se hace borbotear, durante dos horas, a 40°-45° C, una corriente de fosgeno; la mezcla se agita hasta la disolución completa del producto; el disolvente se elimina en vacío y el residuo se recoge en benceno y se filtra. El producto cristaliza en acetona; 5,4 g. de DL-5-fenil-dihidro-1,3-oxazina-2,6-diona, punto de fusión 120°-124° C, con descomposición; en un segundo proceso se añaden 45,8 g. de sal sódica de ácido 6-amino-penicilánico, disueltos en 12 cm³ de agua a 0° C, a una solución, previamente enfriada a 10°-15° C, de 3,7 g. de DL-5-fenil-dehidro-1,3-oxazina-2,6-diona en 25 cm³ de acetona. Después de 30 minutos, la mezcla se ajusta a un pH de 4,6, se filtra y el filtrado se evapora a sequedad en vacío para obtener un producto bruto, que se recoge en alcohol metílico y se filtra; la solución clara lograda se evapora a sequedad para obtener DL-beta-amino-fenil-etil-penicilina, con punto de fusión 220°-225° C.

⁵⁶⁵ AHOEPM, patente 284.254; la memoria descriptiva consta de 37 páginas mecanografiadas; como domicilio social de la empresa figura East Syracuse (Nueva York. EE.UU). El texto de la memoria se basa en la solicitud de patente estadounidense 169.657, de 29 de enero de 1962. La solicitud ante la Administración española fue presentada el 17-I-1963; concedida el 5-VI-1963 y publicada el 16-VII-1963.

⁵⁶⁶ Los autores se muestran conocedores de la patente norteamericana 2.985.648, cuyo método para elaborar alfa-amino-bencil-penicilina se demostró como difícil de llevar a la práctica. La preparación de alfa-amino-bencil-penicilina, según dicha patente, se realizaba del siguiente modo: se prepara el ácido alfa-amino-fenil-acético; se protege el grupo amino del ácido mediante la reacción adecuada, por ejemplo con cloruro de benzoxi-carbonilo, para formar el ácido alfa-carbo-bencil-oxi-amino-fenil-acético y un anhídrido mixto derivado de dicho compuesto; sigue la reacción del anhídrido mixto con ácido 6-amino-penicilánico, la extracción del grupo protector del grupo amino y, finalmente, la purificación del producto.

⁵⁶⁷ Partiendo de los trabajos de Emil FISCHER (“Synthese von Polypeptiden, XIII. Chloride der Aminosäuren und Polypeptide und ihre Verwendung zur Synthese”. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 38(3): 2914-2925. Berlín, 1905), los autores sostienen que los hidrocloreto de cloruro de aminoácidos reaccionan rápidamente con el agua y que ambos átomos de cloro se convierten en iones cloro al contacto con el agua fría, pudiendo fácilmente ser valorados con nitrato de plata. Estos hidrocloreto de cloruro de aminoácidos se pueden emplear para formar péptidos, reaccionando en condiciones anhidras con otros aminoácidos en los cuales el grupo carboxílico está protegido; es necesaria una posterior saponificación, a temperaturas elevadas.

6-amino-penicilánico, en medio acuoso, a una temperatura comprendida entre -40°C y $+50^{\circ}\text{C}$ ⁵⁶⁸.



R^1 , R^2 y R^3 son, cada uno de ellos, hidrógeno, nitro, di-alquil-amino (inferior), acilo-amino (donde el agente acilante es un ácido carboxílico alifático que contiene 1 a 10 átomos de carbono), alquilo inferior, flúor, cloro, bromo, yodo, alcoxi, alquiltio (inferior), sulfamilo, bencilo, fenetilo, ciclo-heptilo, ciclo-hexilo, ciclo-pentilo y trifluorometilo⁵⁶⁹.

El hidroccloruo del cloruro de 2-fenilo-glicílico se añade en porciones pequeñas y frecuentes, por ejemplo en 10 a 100 porciones iguales, esparcidas sobre la superficie, o dispersadas ampliamente en otras formas sobre la solución del ácido 6-amino-penicilánico. Como se trata de una reacción heterogénea, es preferible, aunque no esencial, que las partículas de hidroccloruo de cloruro 2-fenilo-glicílico sean de tamaño pequeño, de menos de 5 micrones de diámetro por término medio. Esta reacción ha de realizarse a un pH ácido, de preferencia a pH entre 1,5 y 3,0; el pH puede regularse, si fuese necesario, mediante la adición de hidróxido sódico acuoso o de trietil-amina. Para obtener el máximo rendimiento es ventajoso, aunque no esencial, añadir a la solución acuosa del ácido 6-amino-penicilánico cantidades de un cloruro inorgánico, como por ejemplo cloruro de sodio o cloruro de calcio, hasta conseguir la saturación. También es ventajoso utilizar, en el medio de reacción, un solvente orgánico soluble en agua que, preferentemente, no reaccione con un hidroccloruo ácido, como podría ser acetona, en una proporción de 20% a 90% del volumen final⁵⁷⁰.

En los productos empleados, el átomo de carbono del grupo acílico, que está unido al grupo amino, es un átomo de carbono asimétrico y estos productos pueden existir en dos forma isómeras, ópticamente activas, diastereoisómeros D(-) y L(+), así como también en la forma DL, ópticamente inactiva. Las formas isómeras mencionadas se obtienen por el uso de la forma apropiada del hidroccloruo de cloruro 2-fenil-glicílico como reactivo inicial; los autores indican dos procedimientos de preparación de este producto:

- Procedimiento primero: se suspende D(-)-2fenil-glicina (25,0 g., 0165 moles; $[\alpha] = -153^{\circ}$), en dicloruro de metileno; se le añade penta-cloruro de fósforo (63,0 g.; 0,30 moles) a la suspensión; al cabo de 10 minutos se añaden 2 ml. de dimetil-formamida que se agita primeramente, durante 10 minutos, en un baño helado y, después, durante 2 horas, a la temperatura ambiente. Se ha formado hidroccloruo de cloruro 2-fenil-glicílico, que se recoge por filtración, se lava con dicloruro de metileno y éter y se seca al vacío, con P_2O_5 , durante 2 horas. La masa del producto resultante es de 19,6 g.

⁵⁶⁸ Aun cuando la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción puede variar entre límites amplios, es preferible realizarla entre -20°C y 0°C . El periodo de reacción puede variar entre 1 y 120 minutos, siendo preferible que esté comprendido entre 20 y 60 minutos.

⁵⁶⁹ En las formas preferentes señaladas por los autores, R^1 es hidrógeno o cloro, R^2 y R^3 son hidrógeno y el hidroccloruo del cloruro 2-fenil-glicílico, es hidroccloruo de cloruro (D)-2-fenil-glicílico.

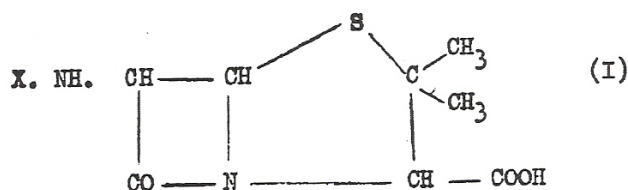
⁵⁷⁰ Otros posibles disolventes pueden ser dioxanos o tetra-hidro-furanos; los autores señalan que se debe dar preferencia a los solventes volátiles, porque pueden extraerse fácilmente por destilación y en vacío al final de la reacción. Estas medidas son de importancia cuando la reacción se realiza a 0°C o a temperaturas menores.

- Procedimiento segundo: una suspensión de N-fenil-glicina seca (10,0 g.; 0,066 moles), en 400 ml. de tetracloruro de carbono, es enfriada hasta 0° C; a esta solución enfriada se le añade penta-cloruro de fósforo (1,5 g.; 0,072 moles); se agita la mezcla durante 5 minutos en un baño de hielo y, después, a la temperatura ambiente durante 18 horas. Se ha formado hidrocloreto de cloruro DL-2-fenil-glicílico que se recoge por filtración, se lava con éter seco y se seca al vacío, con P₂O₅, durante 3 horas. La masa del producto obtenido es de 11,2 g. (82% de la producción teórica).

Los autores exponen algunos ejemplos prácticos que ilustran su procedimiento⁵⁷¹. Las penicilinas producidas por este método pueden convertirse en sales metálicas no tóxicas, como sales de sodio, potasio, calcio, aluminio y amonio y sus sales amónicas sustituidas no tóxicas con una amina (procaína) o piperidina (n-etil-piperidina).

El 25 de octubre de 1963, la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger un "Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas"⁵⁷², desarrollado por John-Hertbert-Charles Naylor y Harry Smith, ambos de nacionalidad británica.

El procedimiento sigue ocupándose de productos ya trabajados -y registrados en España⁵⁷³-, relativos a derivados de penicilina de fórmula general (I)



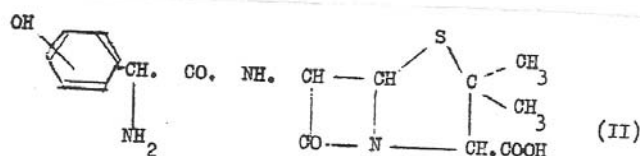
en donde X es un grupo acilo amino-sustituido, que cuenta hasta con 20 átomos de carbono y responde a la fórmula R-(CH₂)_n-CH-[N₂H]-CO-, en la que R es hidrógeno o un grupo amino, carboxilo o alquilo, arilo, aralquilo o heterocíclico sustituido o sin sustituir, y n es cero o un entero.

Los autores presentan, en esta ocasión, la formación de nuevos compuestos relacionados con la fórmula general (II) y sales atóxicas de las mismas;

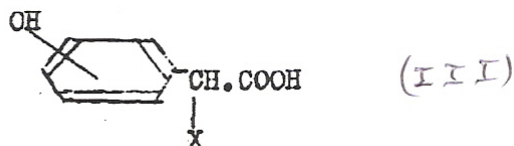
⁵⁷¹ De entre el conjunto de ejemplos propuestos por los autores dejamos anotado sólo el primero: una cantidad de ácido 6-amino-penicilánico (2,26 g.; 0,01 moles) se disuelve en 50 ml. de agua que contiene 3 ml. de HS₂O₄ 6 N; se enfría a 0° C y se le añade, de una sola vez, hidrocloreto de cloruro 2-fenil-glicílico sólido (3,0 g., 0,015 moles). Por efecto de la adición del ácido, la temperatura subió a 10° C y se obtuvo una solución amarilla clara; el pH permaneció por debajo de 2; la agitación continuó durante 20 minutos, en un baño de hielo; se extrae del mismo y se sigue agitando durante 5 minutos; el pH se ajusta a un valor de 4,5 al adicionarle NaOH al 10%. Comienza la precipitación de un sólido (se estima que es 2-fenil-glicina), recogiendo 1,9 g.; el filtrado acuoso que contenía alfa-amino-bencil-penicilina se evaporó hasta conseguir el secado total. Se obtuvieron 4,7 g. de alfa-amino-bencil-penicilina impura, como se demostró por cromatografía en papel.

⁵⁷² AHOEPM, patente 292.910. El expediente se corresponde con la solicitud de patente británica 41541/62, presentada el 2 noviembre de 1962. La empresa está domiciliada en Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente española fue concedida el 3-XII-1963 y publicada el 16-I-1964.

⁵⁷³ Cf. AHOEPM, patente 252.422 -*vide supra*-



el procedimiento registrado comprende la reacción del ácido 6-amino-penicilánico, o una sal del mismo, con un derivado reactivo de un ácido carboxílico de fórmula general (III), donde X representa un grupo amino o un grupo que puede transformarse en él.



Estos compuestos se preparan y aíslan de la manera descrita en otras patentes de este mismo grupo; es decir por hidrogenación catalítica del derivado N-bencil-oxi-carbonilo. Como variante, este tipo de compuestos puede obtenerse formando una alfa-bromo-hidroxi-bencil-penicilina, o una sal atóxica de ésta, y haciéndola reaccionar con hexa-metil-entetramina; o formando una alfa-azido-hidroxi-bencil-penicilina, o una sal atóxica de ésta, e hidrogenándola catalíticamente. En ciertos casos, es deseable proteger el grupo fenólico así como el grupo amino antes de acoplarlos con ácido 6-amino-penicilánico, siendo separados luego ambos grupos protectores en la hidrogenación final; adecuados grupos O-protectores son el bencilo y el bencil-oxi-carbonilo⁵⁷⁴.

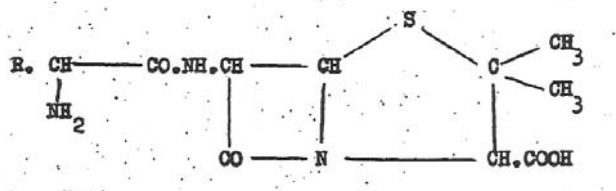
El 27 de noviembre de 1963 es, de nuevo, la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* la que presenta, ante el registro de patentes español, un

⁵⁷⁴ Los autores ofrecen algunos casos prácticos para la formación de 6-(O,N,dibencil-oxi-carbonil-p-oxi-dl-alfa-amino-fenil-acetamido)-penicilinato potásico; 6-(m-hidroxi-dl-alfa-bencil-oxi-carbonil-amino-fenil-acetamido)-penicilinato sódico, 6-(o-bencil-oxi-dl-alfa-bencil-oxi-carbonil-amino-fenil-acetamido)-penicilinato sódico, ácido 6-(p-hidroxi-dl-alfa-amino-fenil-acetamido)-penicilánico, ácido 6-(m-hidroxi-alfa-amino-fenil-acetamido)-penicilánico, ácido 6-(o-hidroxi-dl-alfa-amino-fenil-acetamido)-penicilánico.

Nos ocupamos del primero de ellos: se añadió cloro-carbonato etílico (2,2 ml.) a una solución helada de ácido O,N,dibencil-oxi-carbonil-p-oxi-dl-alfa-amino-fenil-acético (10 g.) y trietil-amina (3,85 ml.) en acetona seca (193 ml.); se agitó la mezcla a 0° C durante 5 minutos, en cuyo tiempo precipitó hidrocloreto trietil-amínico. Se enfrió la suspensión a -30° C y se agitó vigorosamente mientras se añadía, tan rápidamente como fue posible, una solución helada de ácido 6-amino-penicilánico (5,85 g.) en bicarbonato sódico acuoso al 3% (193 ml.), no dejando subir nunca la temperatura por encima de 0° C. La solución resultante, clara, fue agitada durante 30 minutos a 0° C y luego, durante otros 30 minutos, sin enfriamiento externo; finalmente se extrajo con éter dietílico (3 x 200 ml.), reteniéndose solamente la fase acuosa. Esta fase acuosa se llevó a un pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico, y el ácido 6-(O,N,dibencil-oxi-carbonil-p-oxi-dl-alfa-amino-fenil-acetamido)-penicilánico así liberado fue extractado con éter dietílico (50 ml. y 2 porciones de 30 ml.). Se lavó la fase etérea con agua (3 x 5 ml.) y se desecharon los lavados acuosos. Finalmente se convirtió la penicilina en la sal sódica agitando la solución etérea con suficiente bicarbonato sódico al 3% para dar una fase acuosa neutra, separándose esta última y evaporándose a baja presión y a temperatura inferior a 20° C. El producto fue secado finalmente sobre pentóxido de fósforo en vacío para dar 6-(O,N,dibencil-oxi-carbonil-p-oxi-alfa-amino-fenil-acetamido)-penicilinato sódico (9,2 g.), que mostró una zona simple de actividad antibiótica sobre un cromatograma de papel.

expediente para proteger “Un procedimiento para la preparación de penicilinas”⁵⁷⁵, diseñado por los británicos George Robert Fosker y John-Herbert-Charles Nayler.

Esta patente se refiere a un procedimiento para la preparación de penicilinas alfa-amino-sustituidas, de la fórmula general indicada bajo estas líneas -y sus sales atóxicas-.



R es un átomo de hidrógeno o un grupo heterocíclico, alquilo, arilo o aralquilo.

Este procedimiento comprende el acoplamiento de ácido 6-amino-penicilánico con el adecuado ácido carboxílico, sustituido con amino, protegido en N, preparado haciendo reaccionar el ácido carboxílico sustituido por amino con un aldehído e hidrolizando a continuación la penicilina, protegida en N, que se forma.

El aldehído empleado para formar el ácido carboxílico sustituido con amino protegido en N es, preferiblemente, un aldehído aromático o heteroaromático que contenga un sustituyente ortohidróxilo, como salicil-aldehído, 5-cloro-salicil-aldehído, 3-5-dicloro-salicil-aldehído, 2-hidroxil-1-naftaldehído, o 3-hidroxipiridina-4-aldehído.

Las penicilinas protegidas en N se preparan haciendo reaccionar ácido 6-amino-penicilánico con un anhidro mezclado, que se logra haciendo reaccionar el ácido carboxílico con un éster de ácido cloro-carbónico, por ejemplo cloro-carbonato de etilo. Otros métodos utilizados para formar la penicilina protegida en N son procedimientos utilizados en la síntesis peptídica e incluyen el uso de dicitlo-hexil-carbodiimidas y carbonil-imidazol. La subsiguiente regeneración de la penicilina libre sustituida en el grupo amino se efectúa por medio de hidrólisis suave de la penicilina protegida en N, por ejemplo con un ácido mineral muy diluido.

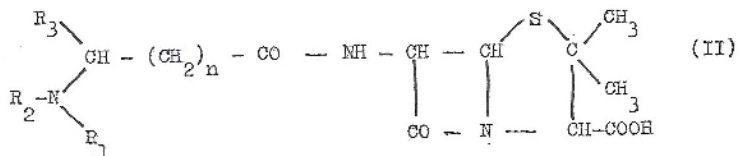
Los compuestos formados por este procedimiento, como todos los de esta serie, son valiosos agentes antibacterianos además de útiles suplementos nutritivos en la alimentación animal, agentes para el tratamiento de la mastitis en el ganado y productos terapéuticos para aves y otros animales, incluido el hombre⁵⁷⁶.

⁵⁷⁵ AHOEPM, patente 293.930; la memoria descriptiva consta de nueve páginas escritas a máquina, firmadas en Madrid, a 27 de noviembre de 1963. La empresa figura como establecida en Great West Road, Brentford (Middlesex, Inglaterra). Esta solicitud se corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 27 de noviembre de 1962, bajo el número 44.728/62. La patente española fue concedida el 25-I-1964 y publicada el 1-III-1964.

⁵⁷⁶ Los autores incluyen en la memoria media docena de ejemplos ilustrativos de este procedimiento; nos ocupamos del primero de ellos: una suspensión de norvalina DL (3,5 g.) y 2-hidroxil-1-naftaldehído (5,2 g.) en una mezcla de etanol (250 ml.) y metanol (20 ml.), fue refluída hasta que resultó una solución amarilla clara. La mezcla fue evaporada luego a presión reducida y el residuo fue lavado con éter y recristalizado a partir de etanol hasta formar cristales amarillos de N-(2-hidroxil-1-naftilmetileno)-DL-norvalina (5 g.), una sustancia con punto de fusión de 171°-173° C (con descomposición). Este aminoácido protegido en N (2,7 g.), fue disuelto en una mixtura de acetona seca (100 ml.), dioxano (25 ml.) y 2,6-lutidina (1,35 ml.); esta solución fue inmediatamente enfriada a -5° C, tratada con clorocarbonato de etilo (0,95 ml.) y agitada a 0° C durante 10 minutos, durante los cuales se precipitó hidrocloruro de lutidina y se formó el anhidrido mezclado en solución. La suspensión fue enfriada entonces a -45° C, y agitada vigorosamente mientras se añadía, lo más rápidamente posible, una solución helada de ácido 6-amino-penicilánico (2,15 g.) en bicarbonato de sodio acuoso (28 ml.) al 3%, no permitiéndose nunca que la temperatura de la mixtura se elevara por encima de 0° C. La solución amarilla resultante fue agitada durante 30 minutos a 0° C y luego, durante otros 30 minutos, sin enfriamiento

2.2.7.c. Amino-carboxi penicilinas

El 20 de julio de 1960 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, “Un método para la producción de penicilinas”⁵⁷⁷, mediante la acilación del ácido 6-amino-penicilánico con ácidos amino-carboxílicos acilados⁵⁷⁸; se producen así penicilinas que tienen por fórmula general la indicada en la figura (II),



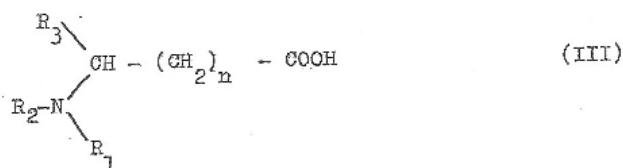
R₁ es un grupo acilo que incluye un grupo glicilo acilado y un grupo glicil-glicilo acilado / R₂ es hidrógeno o metilo / R₃ es un grupo de hidrocarbonato alifático, lineal o ramificado, con uno o más de cuatro átomos de carbono, que puede estar sustituido por un grupo alcoxi de pocos átomos de carbono, un grupo metil-mercapto, un grupo amino acilado, un grupo fenilo, un grupo carboxamido, un grupo indilo, un grupo ureído o un grupo guanidino. / R₂ y R₃ forman, junto con el átomo de carbono y el átomo de nitrógeno, con el cual están unidos, un anillo de pirrolidina. / n adopta valores de 0,1, 2, 3 ó 4.

exterior. A continuación fue extraída con éter (23 x 150 ml.), quedando retenida la fase acuosa únicamente; esta última fue llevada a un pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico diluido y extractada rápidamente con éter (100 ml. en 3 porciones). Estos segundos extractos de éter, que contienen penicilina protegida en N, fueron lavados con agua (10 ml.) y luego extraídos con suficiente bicarbonato de sodio al 3% para producir una fase acuosa neutra, que fue separada y evaporada a temperatura y presión bajas. Se observó que el residuo (2 g.), mediante cromatografía de papel de una pequeña porción, contenía la sal de sodio de penicilina con N protegido y, además, había alfa-amino-metil-penicilina libre. Con el fin de completar la separación del grupo N-arilideno, el producto antes mencionado fue disuelto en agua (50 ml.), llevado a un pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico diluido y tratado con acetona suficiente para volver a disolver el precipitado inicial. La solución amarilla fue agitada durante 45 minutos y extraída entonces con éter (3 x 550 ml.) para separar el 2-hidroxi-1-naftaldehído. La fase acuosa fue reajustada a pH 7 con bicarbonato de sodio y luego evaporada hasta quedar seca a baja temperatura y presión. La alfa-amino-butil-penicilina residual (1,6 g., después de su desecación sobre pentóxido de fósforo *in vacuo*) fue estimada de una pureza del 41% mediante análisis colorimétrico con hidroxil-amina. La identidad del producto fue confirmada mediante cromatografía de papel.

⁵⁷⁷ AHOEPM, patente 259.767; la memoria descriptiva consta de once hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 30 de julio de 1960. La empresa figura como establecida en 11, Ballerup Byvej, Ballerup (Dinamarca). Esta solicitud se corresponde a las presentadas en Gran Bretaña, el 21 de julio de 1959, bajo el número 25.053/59 y el 26 de agosto de 1959, con el número 29.248/59. La patente española fue concedida el 10-XII-1960 y publicada el 16-I-1961.

⁵⁷⁸ El ácido amino-carboxílico acilado que se emplea para la acilación de ácido 6-amino-penicilánico, en este procedimiento, puede producirse por los métodos de acilación conocidos, por ejemplo acilando el ácido amino-carboxílico con el cloruro de acilo correspondiente; según indican los autores, por este método se obtuvo la N-fenoxi-acetil-D,L-prolina, tal y como se indica a continuación: en una disolución de 20 ml., acuosa, fría, de NaOH 1 N, se disolvieron 2,3 g. de D,L-prolina; sobre la nueva disolución resultante se añadieron, gota a gota, mientras se agitaba y se enfriaba con hielo, 3,74 g. de cloruro de fenoxi-acetilo junto a NaOH acuoso 1 N, de manera que la mezcla permaneció ligeramente alcalina durante la adición; a continuación, la mezcla se acidificó a pH 1,5 mediante ácido clorhídrico; de esta forma, el producto de acilación se separó como un aceite, que cristalizó en presencia de la fase acuosa rascando la pared de la vasija con una espátula; los cristales fueron filtrados y se volvieron a cristalizar en agua. Se obtuvieron 3,2 g. de la sustancia deseada, con un punto de fusión de 134°-136° C.

El método comprende hacer reaccionar el ácido 6-amino-penicilánico⁵⁷⁹ con un anhídrido mixto de un ácido de fórmula general (III), con otro ácido, en cuya fórmula R₁, R₂, R₃ y n tienen el significado indicado al pie de la figura anterior.



El ácido con el que el ácido de fórmula (III) forma el anhídrido mixto puede ser ácido acético o ácido benzoico. La reacción se realiza más fácilmente cuando se usa un ácido de la fórmula (III) con un mono-éster de ácido carbónico, como podía ser el éster etílico⁵⁸⁰. Los autores ilustraron este procedimiento con algunos ejemplos, a través de los cuales obtienen sal potásica de N-fenoxi-acetil-amino-etil-penicilina⁵⁸¹, sal potásica de N-fenoxi-acetil-2-pirrolidil-penicilina y otras cincuenta y dos penicilinas más, que se listan en la memoria; de todas ellas se determinó la actividad bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* (una cepa que no produce penicilinas), *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae* y la resistencia frente a la descomposición de penicilinas de *Bacillus cereus*. Las penicilinas fueron ensayadas en forma de sus sales potásicas.

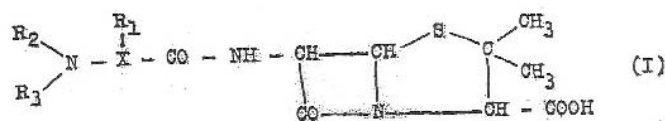
El 4 de agosto de 1960 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presentó a registro un expediente de patente para proteger, por veinte años,

⁵⁷⁹ Los autores remiten, para la obtención del ácido 6-amino-penicilánico a la descripción de Frank Ralph BATCHELOR, Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON. "Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations". *Nature*, 183: 257-258. Londres, 1959; y a las solicitudes de patentes británicas 15.605/59, 21.195/59, 28.080/59 y 1.445/60.

⁵⁸⁰ Cuando R₂ y R₃ de la fórmula (III) son hidrógeno, la fórmula representa un grupo de ácidos amino-carboxílicos acilados; así, por ejemplo, si n=3 se tienen los ácidos gamma-acil-amino-butíricos; si n=0 y R₂ es hidrógeno, la fórmula representa acil-derivados de un cierto número de ácidos alfa-amino-carboxílicos que se encuentran en las proteínas, tales como alanina, leucina, lisina, esparaguina, glutamina y triptófano; cuando n=1 y R₂ es hidrógeno, la fórmula representa beta-alaninas aciladas; cuando n=0, R₂ es metilo y R₃ es hidrógeno, la fórmula representa acil-sarcosinas; cuando n=0, R₁ y R₂ son hidrógenos y R₃ es un grupo glicilo o un grupo acil-glicil-glicilo, la fórmula representa acil-glicil-glicinas o acil-glicil-glicil-glicinas respectivamente.

⁵⁸¹ Nos limitaremos a comentar este caso: en un volumen de 10 ml. de tetra-hidro-furano se disolvieron 627 mg. de fenoxi-acetil-glicina y 0,42 ml. de trietil-amina; la solución resultante se enfrió a -10° C; a continuación se añadieron 0,3 ml. de cloro-carbonato de etilo, gota a gota, mientras se agitaba; durante unos 10 minutos se mantuvo la suspensión a -10° C y luego se enfrió a -30° C, con lo cual el hidro-cloruro de trietil-amina cristalizó y se separó por filtración. Sobre 3,5 ml. del filtrado se añadió una solución de 254 mg. de 6-amino-penicilinato potásico en 3 ml. de agua y se ajustó el pH a 7 por medio de una solución diluida de hidróxido potásico. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente, seguida de agitación; luego se añadieron 12 ml. de butanol normal y la mezcla resultante se concentró por destilación en el vacío. Cuando se hubo separado, por destilación, el tetra-hidro-furano y el agua, se recuperaron 290 mg. de la sal potásica de fenoxi-acetil-amino-metil-penicilina, cristalina, bruta. La sal se separó por filtración y se volvió a cristalizar en una mezcla de etanol/éter; se obtuvieron 220 mg. de dicha sal, con una pureza del 95%.

una invención relativa a “Un método para la producción de penicilinas”⁵⁸², del tipo señalado en la fórmula general (I), con marcado carácter hidrófilo:



X es un grupo de hidrocarbonato alifático, lineal o ramificado, trivalente; un grupo fenoxi-alcoholo o un grupo alcohol-fenoxi-alcoholo, cuyo componente alcoholo puede ser normal o ramificado. / R₁ es un hidrógeno, fenilo o fenoxi. / R₂ y R₃ son alcoholos formados por un número bajo de átomos de carbono, arilos o alcoholos sustituidos por arilos, los mismos o diferentes, o forman junto con el átomo de nitrógeno un sistema anular, tal como piperidina, pirrolidina, etilenoimina o morfolina y las sales no tóxicas de éstas.

El método operativo de este procedimiento consiste en acilar el ácido 6-amino-penicilánico⁵⁸³ con un derivado de un ácido amino-carboxílico de fórmula general (II), en donde X, R₁, R₂ y R₃ tiene el significado antes indicado



El derivado del ácido amino-carboxílico puede ser el cloruro del ácido o un anhídrido. El anhídrido será, preferiblemente, un anhídrido mixto con otro ácido carboxílico; es muy conveniente usar el anhídrido mixto del ácido amino-carboxílico con mono-éster de ácido carboxílico, por ejemplo el éster mono-etílico.

Los autores ilustran este procedimiento con treinta y dos ejemplos⁵⁸⁴; se determinaron, por dilución en serie, las actividades de las treinta y dos penicilinas

⁵⁸² AHOEPM, patente 260.157; la memoria descriptiva consta de ocho hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 4 de agosto de 1960. La empresa consta como establecida en 11, Ballerup Byvej, Ballerup (Dinamarca). Esta solicitud se corresponde a las presentadas en Gran Bretaña, el 5 de agosto de 1959, bajo el número 26.8122/59 y el 29 de septiembre de 1959, con el número 33.099/59. La patente española fue concedida el 15-IX-1960 y publicada el 1-XI-1960.

⁵⁸³ Como en el caso anterior (AHOEPM, patente 259.767), los autores remiten, para la obtención del ácido 6-amino-penicilánico a la descripción de Frank Ralph BATCHELOR, Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON. “Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations”. *Nature*, 183: 257-258. Londres, 1959; y a las solicitudes de patentes británicas 15.605/59, 21.195/59, 28.080/59 y 1.445/60.

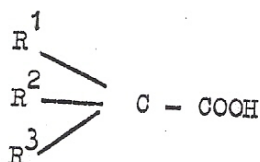
⁵⁸⁴ Comentamos el primero de ellos, dedicado a la formación de di-etil-amino-metil-penicilina: se suspendieron 330 mg. de ácido di-etil-amino-acético en 30 ml. de tetra-hidro-furano; a la suspensión se añadieron 0,35 ml. de trietil-amina y se agitó a la temperatura ambiente durante unos 10 minutos. A continuación, la suspensión se enfrió a -5 ° C y se añadieron 0,25 ml. de cloro-carbonato de etilo, gota a gota, agitando al mismo tiempo; después de agitar durante 15 minutos a -5° C, la suspensión se enfrió a -30° C. El hidro-cloruro de trietil-amina formado durante la reacción se separó por filtración; al filtrado se le adicionó una solución de 508 mg. de la sal potásica del ácido 6-amino-penicilánico en 3 ml. de agua; la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se destiló al vacío el tetra-hidro-furano, se le añadieron 10 ml. de butanol y se separó el agua por destilación azeotrópica en vacío, con ello se consiguió separar la sal potásica cristalina de dietil-amino-metil-penicilina. Se filtró y se lavó con butanol normal y después con éter; se obtuvieron así 450 mg. de dicha sal potásica, con un grado de pureza de

sintetizadas contra *Staphylococcus aureus* (una cepa que no produce penicilinas), *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*, a la par que la resistencia frente a la actividad de descomposición de penicilinas, a partir de *Bacillus cereus*.

2.2.7.d. Alquil penicilinas

En los comienzos de 1960, el 22 de enero, la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, una invención relativa a un “Proceso para la preparación de penicilinas y sales atóxicas de las mismas”⁵⁸⁵; el procedimiento figura como diseñado por los británicos Frank Peter Doyle y John-Herbet-Charles Nayler y alude a las penicilinas derivadas del ácido 6-amino-penicilánico.

En este procedimiento, el ácido 6-amino-penicilánico es puesto en reacción con un cloruro, bromuro o anhídrido ácidos o anhídrido mixto derivado de un ácido acético trisustituido de formula general



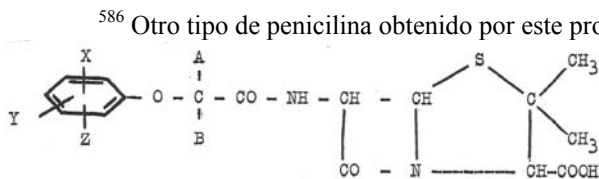
R^1 y R^2 son iguales o diferentes y están formados, cada uno de ellos, por un átomo halógeno o un grupo alquilo, alquenoilo, arilo, aralquilo, ciclo-alquilo o heterocíclico, cuyos grupos pueden ser sustituidos; o bien R^1 y R^2 , juntamente con el átomo de carbono al que van ligados, forman un sistema de anillos aromáticos, ciclo-alifáticos o heterocíclicos.

R^3 es cualquiera de los grupos definidos bajo R^1 y R^2 , o el grupo OR^4 o SR^4 , en los que R^4 es un grupo alquilo, alquenoilo, arilo, aralquilo o ciclo-alquilo y sales atóxicas de los mismos.

Las penicilinas obtenidas por este procedimiento tienen por fórmula general⁵⁸⁶

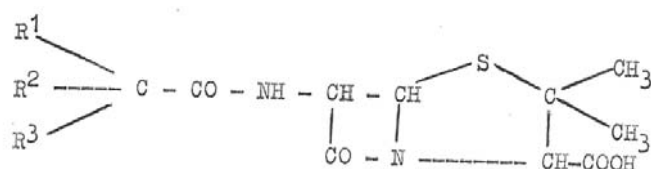
96%. El espectro infrarrojo de la sal sólida en bromuro potásico sólido presentó bandas de absorción intensas a 1208, 1248, 1260, 1330, 1395, 1432, 1495, 1610, 1675, 1752 y 1775 cm.; utilizando los sistemas cromatográficos descritos en W.J. ROULSTON, L.F. HITCHCOCK (“Depletion of Gamma Isomer of Benzene Hexachloride in Cattle Dipping-Fluids”. *Nature* 172: 546-547. Londres, 1953) y Frank Ralph BATCHELOR, Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON (“Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations”. *Nature*, 183: 257-258. Londres, 1959), el producto acusó valores R de 0 y 0,30, respectivamente.

⁵⁸⁵ AHOEPM, patente 255.209; la extensa memoria, de 53 páginas escritas a máquina, queda firmada en Madrid, a 22 de enero de 1960; como domicilio social de la empresa figura Great West Road Brentford-Middlesex (Inglaterra). El expediente se ha formado sobre los de las solicitudes británicas 2435/59 de 22-I-1959, 35546/59 de 20-X-1959, 36204/59 de 20-X-1959 y 38304/59 de 11-XI-1959. La patente española fue concedida el 7-III-1960 y hecha pública el 16-V-1960.



X, Y y Z son iguales o diferentes, cada una es un hidrógeno, nitrógeno o un átomo halógeno o un grupo amino, alquil-amino, dialquil-amino, acila-amino, alcanoil-amino, alquilo, alcoxi, hidroxilo, sulfamilo, bencilo, ciclo-exilo, ciclo-pentilo o trifluoro-metilo.

A y B son iguales o diferentes, cada una son un grupo alquilo, fenilo o fenil-alquilo.



En aquellos casos en que el ácido contiene un agrupación como amina o alquil-amina, que puede reaccionar con un agente acilador, tal grupo puede ser protegido en la forma común antes de la formación del cloruro, bromuro, anhídrido o anhídrido mixto ácido. La subsiguiente separación del grupo protector para formar la penicilina libre amino-sustituída o alquil-amino-sustituída puede efectuarse mediante hidrogenación catalítica, por ejemplo con paladio o platino sobre carbonato bórico o sobre carbono⁵⁸⁷. También es posible preparar aquellas penicilinas en las que el sustituyente es un grupo amino formando las correspondientes nitro-penicilinas, que son luego hidrogenadas por medios ordinarios para formar el derivado amino. Cuando se emplea un cloruro ácido, bromuro ácido o anhídrido ácido, se puede partir del correspondiente ácido acético trisustituído.

Un proceso de preparación de un compuesto del tipo de los señalados en este procedimiento, mediante un anhídrido mixto con un ácido etoxi- o isobutoxi-carbónico, comprende la mezcla de un ácido de fórmula general $(R^1, R^2, R^3)C-COOH$, con clorofornato de isobutilo y una amina terciaria alifática, tal como trietil-amina, en un disolvente anhidro, inerte y preferiblemente miscible en agua, como p-dioxano y, si se desea, acetona seca pura, durante unos treinta minutos en frío. A esta solución del anhídrido se le añade una solución enfriada de ácido 6-amino-penicilánico y una amina terciaria, por ejemplo trietil-amina, en un disolvente tal como el agua. La mezcla de reacción es agitada durante una hora para formar la sal amónica sustituida del producto deseado. Si se quiere, puede extraerse luego la mezcla a un pH alcalino (puede emplearse bicarbonato sódico acuoso por ejemplo, si fuese preciso ajustar el pH), con un disolvente inmiscible en agua, tal como éter, para separar los productos iniciales que no han reaccionado. Luego se transforma el producto en la fase acuosa en ácido libre, preferiblemente en frío, bajo una capa de éter, mediante la adición de un ácido mineral diluido, por ejemplo ácido sulfúrico, en un pH 2. A continuación se extrae el ácido libre en un disolvente inmiscible con agua, orgánico y neutro, como éter, y se lava el extracto con agua rápidamente en frío; luego se seca, por ejemplo con sulfato sódico anhidro. El producto contenido en el extracto etéreo, en su forma de ácido libre, se convierte en cualquier sal metálica o amina deseada, mediante tratamiento con la base apropiada, por ejemplo una amina libre o una solución de 2-etil-exanoato potásico en n-butanol seco. Estas sales son ordinariamente insolubles en disolventes como el éter y pueden recuperarse en forma pura mediante simple filtración.

Otro método de preparación de una solución etérea de la forma ácida de un compuesto de esta invención comprende la preparación de una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico y bicarbonato sódico, adición de un cloruro ácido derivado de un ácido de fórmula general $(R^1, R^2, R^3)C-COOH$, y vigorosa agitación a la temperatura ambiente durante veinte a sesenta minutos. Luego se extrae la mezcla con éter para separar los productos iniciales que no han reaccionado o hayan resultado hidrolizados. A continuación se acidifica la solución, preferiblemente en frío, a un pH 2, por ejemplo con ácido sulfúrico diluido y se extrae en éter la forma ácida libre del producto. Este

⁵⁸⁷ Grupos protectores adecuados son el grupo tritilo y los grupos de la fórmula general $R''-O-CO-$, en la que R'' es un alilo, bencilo, bencilo sustituido, fenilo o fenilo sustituido.

extracto etéreo se seca, por ejemplo con sulfato sódico anhidro y se separa el agente secador, quedando una solución etérea seca de la que se aísla fácilmente el producto, preferiblemente en forma de una sal potásica. Este procedimiento se emplea cuando el cloruro ácido reacciona con una amina primaria más rápidamente que como lo hace con agua, según queda determinado mediante simple ensayo; en este procedimiento el cloruro ácido puede ser sustituido por el correspondiente bromuro ácido o anhídrido ácido.

Como algunas de las sustancias antibióticas obtenidas mediante este proceso son relativamente inestables, es conveniente escoger unas condiciones de reacción que sean suficientemente moderadas para evitar su descomposición. Naturalmente, las condiciones de reacción escogidas dependerán en gran medida del reactivo químico que se emplee; en muchos casos ha de llegarse a una combinación entre el uso de condiciones muy suaves durante un período prolongado y el empleo de unas condiciones más energéticas durante un período de tiempo corto, con la posibilidad de descomponer parte de las sustancias antibióticas. La temperatura escogida para el proceso de preparación de los derivados del ácido penicilánico no debe rebasar, en general, los 30° C y, en muchos casos, una temperatura adecuada es la ambiente.

Como debe evitarse el uso de condiciones fuertemente ácidas o alcalinas en el proceso, es preferible trabajar a un pH de 6 a 9, lo cual puede conseguirse fácilmente empleando un amortiguador, por ejemplo una solución de bicarbonato sódico o de fosfato sódico. Dado el uso de medios acuosos para la reacción, incluyendo caldos de fermentación filtrados o en solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico crudo, pueden emplearse disolventes orgánicos que no contengan átomos de hidrógeno reactivos⁵⁸⁸.

Es muy conveniente añadir una solución del agente acilador en un disolvente inerte y, preferiblemente, que sea miscible en agua, tal como cetona o dimetil-formamida; es aconsejable una vigorosa agitación cuando se halle presente más de una fase, por ejemplo sólida y líquida o dos líquidas. Al finalizar la reacción, se aíslan los productos mediante técnicas usadas con bencil-penicilina o fenoxi-metil-penicilina⁵⁸⁹. Cuando el compuesto se forma como una sal trietil-amina, el producto es convertido en el ácido libre y, a partir de él, en otras sales⁵⁹⁰.

Un método particularmente adecuado de aislar el producto como sal potásica cristalina comprende la extracción del mismo de una solución ácida acuosa (por ejemplo a pH 2) en éter de dietilo, secado de éste y adición de, por lo menos, un equivalente de una solución de 2-etil-exanoato potásico en n-butanol seco. Se forma la sal potásica, que precipita, ordinariamente en forma cristalina, y se recoge por filtración o decantación.

⁵⁸⁸ Como ejemplo de tales disolventes inertes puede citarse: dimetil-formamida, dimetil-acetamida, cloroformo, acetona, metil-isobutil-cetona y dioxano.

⁵⁸⁹ Puede extractarse el producto en éter de dietilo o n-butanol, a un pH ácido, y recuperarse luego por liofilización o por conversión en una sal insoluble en el disolvente, por ejemplo mediante neutralización con una solución en n-butanol de 2-etil-exanoato potásico, o bien puede precipitarse el producto de una solución acuosa, como una sal insoluble en agua de una amina o recuperarse directamente por liofilización, preferiblemente en forma de una sal sódica o potásica.

⁵⁹⁰ El tratamiento del compuesto trietil-amínico en agua con hidróxido sódico lo convierte en la sal sódica y la trimetil-amina puede separarse por extracción, por ejemplo con tolueno. El tratamiento de la sal sódica con un ácido acuoso fuerte convierte el compuesto en su forma ácida, que puede transformarse en sales aminas, por ejemplo procaina, mediante la reacción con la base amina.

A veces es preferible preparar las nuevas penicilinas partiendo del licor de fermentación original, siempre que contenga ácido 6-amino-penicilánico o uno de sus concentrados. En tal caso, se prepara una solución concentrada de ácido 6-amino-penicilánico cultivando un moho productor de penicilina, tal como el *Penicillium chrysogenum* 5120C, en un medio nutriente del fluido ordinariamente empleado en la preparación de penicilinas bajo condiciones de cultivo aeróbico sumergido, a una temperatura de 25°-27° C y a un pH de 6-9. El licor obtenido después de la fermentación es clarificado y evaporado hasta un pequeño volumen, a temperatura y presión reducidas; luego se ajusta a un pH de 3,0 y el precipitado que se forma es separado por centrifugación, extractándose el licor claro con acetato de butilo para separar las penicilinas. La fase acuosa es separada y el pH ajustado en 7,5; se añade acetona y se separa el precipitado formado. Luego se concentra el licor claro y se ajusta el pH en 7,0. Éste es una solución concentrada de ácido 6-amino-penicilánico; este ácido puede obtenerse del concentrado mediante tratamiento con una resina cambiadora de iones, levigando la resina, concentrando el producto de la levigación y precipitando ácido 6-amino-penicilánico en forma cristalina mediante la adición de un ácido.

Estos compuestos se presentan como agentes antibacterianos, útiles como complementos nutritivos en alimentos para animales, para el tratamiento de la mastitis en el ganado, como agentes terapéuticos en volátiles y otros animales y, en el caso del hombre, adecuados en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias gram-positivas. Otros agentes antibacterianos, como la bencil-penicilina, han sido empleados en la terapia de infecciones debidas a bacterias gram-positivas, pero tales productos tienen el inconveniente de ser ineficaces contra razas penicilina-resistentes de *Staphylococcus aureus* y otros productores de penicilinas. Estas nuevas penicilinas han mostrado ser menos fácilmente destruidas por la penicilinas que las penicilinas G y V comunes⁵⁹¹.

La memoria incorpora más de una cincuentena de ejemplos, agrupados de acuerdo con el sistema de clasificación de ácidos acéticos trisustituidos⁵⁹², en los que se presentan casos prácticos relacionados con este procedimiento⁵⁹³.

⁵⁹¹ Los autores incluyen en la memoria una tabla en la que muestran la actividad de uno de estos nuevos compuestos, en comparación con penicilina G, al ensayarse *in vitro* contra tres razas de estafilococos resistentes.

⁵⁹² Tipo tri-arilo: tri-fenil-metil-penicilina, mono-p-hidroxi-trifenil-metil-penicilina, mono-p-metoxi-trifenil-metil-penicilina, mono-p-metil-tío-trifenil-metil-penicilina, mono-p-metil-sulfonyl-trifenil-metil-penicilina, tri-(p-metoxi-fenil)-metil-penicilina.

Tipo diaril-alquilo: alfa,alfa-difenil-etil-penicilina, alfa,alfa-difenil-propil-penicilina, alfa,alfa-difenil-butil-penicilina, alfa,alfa-difenil-pentil-penicilina, alfa,alfa-difenil-isobutil-penicilina.

Tipo aril-dialquilo: alfa,alfa-dimetil-bencil-penicilina, alfa,alfa-dietil-bencil-penicilina, alfa,alfa,di-n-propil-bencil-penicilina, alfa,alfa-di-n-butyl-bencil-penicilina, alfa,alfa-dicicloexil-bencil-penicilina.

Tipo tri-alquilo: butil-penicilina terciaria, trietil-metil-penicilina, tri-n-propil-metil-etil-penicilina, tri-n-butyl-metil-penicilina.

Tipo diarilo (oxi-sustituido): alfa-metoxi-difenil-metil-penicilina, alfa-etoxi-difenil-metil-penicilina, alfa-isopropoxi-difenil-metil-penicilina, alfa-butoxi-difenil-metil-penicilina.

Tipo diarilo (tío-sustituido): alfa-etil-tío-difenil-metil-penicilina, alfa-n-propil-tiodifenil-metil-penicilina, alfa-n-butyl-tío-fenil-metil-penicilina, alfa-seg-butyl-tío-difenil-metil-penicilina, alfa-bencil-tío-difenil-metil-penicilina, alfa-fenil-tío-difenil-metil-penicilina.

Tipo di-alquilo (oxi-sustituido): alfa-fenoxi-isopropil-penicilina.

Tipo di-alquilo (tío-sustituido): alfa-fenil-tío-isopropil-penicilina, alfa-etil-alfa-fenil-tío-propil-penicilina, alfa-propil-alfa-fenil-tío-butyl-penicilina.

Tipo di-arilo heterocíclico: alfa,alfa-difenil-2-tienil-metil-penicilina.

Tipo 1-aril-ciclo-alquilo: 1-fenil-cicloexil-penicilina.

Tipo 9-sustituido-9-fluorenilo: 9-p-metoxi-fenil-9-fluorenil-penicilina, 9-metoxi-9-fluorenil-penicilina, 9-etoxi-9-fluorenil-penicilina.

Tipos varios: tricloro-metil-penicilina, alfa-cloro-cicloexil-bencil-penicilina, alfa-bromo-alfa-etil-propil-penicilina.

⁵⁹³ Nos ocupamos, a modo ilustrativo, del primero de ellos, correspondiente al tipo tri-arilo: la tri-fenil-metil-penicilina.

a. Sal sódica cruda: durante un período de 5 minutos fue adicionada una solución de cloruro de trifetil-acetilo (0,8 g.) en cloroformo (10 ml.), una solución de ácido 6-amino-penicilánico (0,5 g., 72% de pureza) en cloroformo (20 ml.) y trietil-amina (1 ml.); la nueva mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una hora. Luego se filtró la solución y se evaporó el disolvente al vacío a baja temperatura; el residuo semisólido fue disuelto en n-butanol (50 ml.) y se añadió agua (30 ml.), seguida de suficiente ácido clorhídrico 1 N hasta conseguir reducir el pH de la fase acuosa a 2,0. Después de agitarse, se separó la capa acuosa y se lavó el butanol dos veces más con ácido clorhídrico muy diluido. Se obtuvo la penicilina de la capa de butanol agitando ésta con suficiente solución de bicarbonato para formar una fase acuosa, separando esta última y eliminando agua a baja temperatura y presión para dejar la sal sódica cruda de trifetil-metil-penicilina en forma de sólido amarillo pálido (0,9 g.); el grado de pureza alcanzado fue de 55%, determinado por ensayo colorimétrico con hidroxil-amina contra una bencil-penicilina tipo; inhibió a *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0,3 mcg./ml., a *Staphylococcus 1* resistente a la bencil-penicilina a 0,6 mcg./ml. y a *Staphylococcus 2* resistente a la bencil-penicilina a 0,6 mcg./ml.

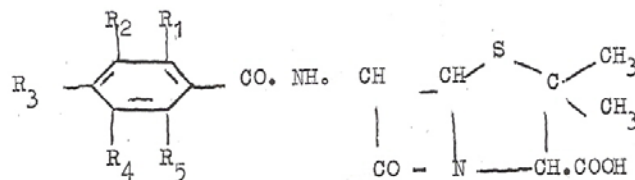
b. Sal bencil-amina: la sal sódica cruda de trifetil-metil-penicilina (150 mg.), preparada de acuerdo con el ejemplo anterior, fue suspendida en agua (15 ml.), cubierta con un volumen igual de éter y acidulada a un pH 2 con ácido clorhídrico diluido, de manera que, después de agitarse, el ácido penicilínico libre pasó a la capa de éter. Esta solución de éter fue separada, lavada con agua, secada sobre sulfato sódico anhidro, filtrada y tratada con 2 ml. de una solución al 2% de bencil-amina en éter. La sal bencil-amina de la penicilina fue precipitada en forma de aceite que lentamente se solidificó al triturarse, probablemente absorbiendo agua de cristalización de la atmósfera durante el proceso. Se recogió el polvo blanco que se había formado, se lavó con éter y se secó. Se obtuvieron 65 mg., tenía un punto de fusión de 98°-100° C, con descomposición. El análisis porcentual dio los siguientes resultados: C (66,9%), H (6,2%), N (6,8%), y S (4,5%), lo que remite al compuesto $C_{35}H_{35}O_4N_3S \cdot H_2O$ [C (66,7%), H (6,2%), N (6,7%) y S (5,1%)].

c. Sal de ciclo-exil-amina: se preparó una solución de trifetil-metil-penicilina en éter de la sal sódica cruda (180 mg.), como se indicó en el paso anterior. El tratamiento con 2 ml. de una solución al 2% de ciclo-exil-amina en éter precipitó la sal ciclo-exil-amina de la penicilina en forma de polvo blanco ligeramente deliquescente, de punto de fusión indefinido, que fue recogido, lavado con éter y secado en un desecador al vacío; se obtuvieron 90 mg. El análisis porcentual dio los siguientes resultados: C ([ilegible]), H (7,4%), N (6,9%) y S (4,6%), lo que remite al compuesto $C_{34}H_{39}O_4N_3S \cdot 2H_2O$ [C (65,7%), H (7,2%), N (6,9%) y S (5,1%)].

d. Sal de N-metil-morfolina: se preparó una solución de trifetil-metil-penicilina en éter partiendo de la sal sódica cruda (170 mg.) obtenida de acuerdo con el procedimiento ya descrito. El tratamiento con 2 ml. de una solución al 2% de N-metil-morfolina en éter precipitó la sal de N-metil-morfolina de la penicilina en forma de aceite incoloro que, lentamente, se solidificó al fraccionarse. El resultante, un polvo blanco, fue recogido, lavado con éter y secado en un desecador al vacío; se obtuvieron 60 mg., con un punto de fusión entre 118°-121° C, con descomposición. El análisis porcentual dio los siguientes resultados: C (66,6%), H (6,3%), N (6,9%) y S (5,3%), lo que remite al compuesto $C_{33}H_{37}O_5N_3S \cdot \frac{1}{2}H_2O$ [C (66,4%), H (6,4%), N (7,0%) y S (5,4%)].

e. Sal sódica pura: durante 15 minutos se añadió una solución de cloruro de fenil-acetilo puro (18,4 g.) en acetona seca (360 ml.) a una solución agitada de ácido 6-amino-penicilánico (13 g., ca. 72% de pureza), en una mezcla de una solución acuosa al 3% de bicarbonato sódico (500 ml.) y acetona (150 ml.); se agitó la mezcla a la temperatura ambiente durante 3 horas, lavándose luego con éter (2 x 600 ml.); se filtró la capa acuosa para separar un poco del sólido suspendido y luego se enfrió a -6° C, después de lo cual cristalizó el producto en placas relucientes. Se recogió, en centrifugadora refrigerada, y se volvió a cristalizar mediante disolución en acetona al 80% (300 ml.), a la temperatura ambiente, seguido de enfriamiento a -6° C. Se recogió la sal sódica cristalina pura, como anteriormente, y se secó en un desecador al vacío para originar un polvo blanco (17,1 g., punto de fusión 100°-120° C) que resultó ser esencialmente el mono-hidrato. Un ulterior secado sobre pentóxido de fósforo a 80° C/0,4 mm., dio una sal anhidra, punto de fusión 183°-190° C (con descomposición), pero esta sal era higroscópica y, tras su exposición al aire, descendió rápidamente el punto de fusión a 100°-120° C. Se volvió a cristalizar y se

Con fecha 19 de mayo de 1960, la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a un "Proceso para la preparación de penicilinas de fórmula general



y sales atóxicas de las mismas⁵⁹⁴; figuran como inventores Frank Peter Doyle, John-Herbert-Charles y Harry Smith, todos de nacionalidad británica.

En estas nuevas penicilinas, R_1 R_2 R_3 R_4 y R_5 representan un átomo de hidrógeno o halógeno o un grupo arilo, acilo, alquilo, ciclo-alquilo, heterocíclico, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, alquenoilo, alquenoil-oxi, alquenoiltio, mercapto, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciloxi, acilto, acilamino, alcoxi-carbonilo, alquil-sulfonio, dialquil-amino, sulfamilo o nitro, siendo los sustitutivos iguales o diferentes y no más de cuatro de ellos átomos de hidrógeno, o completando cualesquiera dos sustitutivos adyacentes un sistema de anillos carbocíclicos insaturados, que a su vez puede ser sustituido. Buena parte de sus sales son atóxicas⁵⁹⁵.

Un tipo preferente de compuestos tiene R_1 y R_5 iguales o diferentes, siendo cada uno de ellas un grupo alquilo, alcoxi o ariloxi o un átomo halógeno y dos cualesquiera de los sustitutivos R_2 , R_3 y R_4 son, cada uno de ellos, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, alcoxi o arilcoxi o un átomo halógeno. Una subclase de ésta consiste en compuestos en los que R_1 y R_5 son iguales o diferentes entre sí, siendo cada uno de ellos un grupo alquilo o alcoxi o un átomo de cloro, bromo o yodo y dos cualesquiera de los sustitutivos R_2 , R_3 y R_4 un átomo de hidrógeno y el tercer sustitutivo otro átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o alcoxi o un átomo de cloro, bromo o yodo.

secó, una vez más, como se describe anteriormente. Los resultados fueron los siguientes: C (65,9%), H (5,2%), N (5,2%), S (6,2%) y Na (4,4%), lo que remite al compuesto $C_{28}H_{25}O_4N_2SNa$ [C (66,1%), H (5,0%), N (5,5%), S (6,4%) y Na (4,5%)].

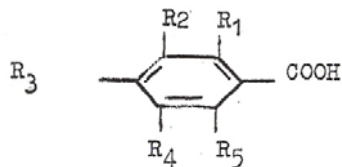
f. Sal potásica pura: ésta se preparó como se describe en el caso anterior, con la excepción de que se utilizó la cantidad equivalente de bicarbonato potásico en lugar de bicarbonato sódico. Después de aislarse y secarse al modo señalado para la sal sódica, la sal potásica anhidra tenía un punto de fusión de 199°-201° C (con descomposición). El análisis porcentual dio los siguientes resultados: C (63,7%), H (4,8%), N (5,1%), S (5,8%) y K (7,4%), lo que remite al compuesto $C_{28}H_{25}O_4N_2SK$ [C (64,1%), H (4,8%), N (5,3%), S (6,1%) y K (7,4%)].

⁵⁹⁴ AHOEPM, patente 252.422; la memoria descriptiva consta de 30 páginas mecanografiadas, fechadas en Madrid, a 19 de mayo de 1960. La patente tiene prioridad inglesa bajo registros 24.335/59 de 15-VII-1959, 28.377/59 de 19-VIII-1959 y [s.n.] de 20-IV-1960. La patente española fue concedida el 13-VII-1960 y publicada el 16-X-1960. La empresa figura domiciliada en Great West Road, Brentford, (Middlesex. Inglaterra).

⁵⁹⁵ Entre ellas se pueden citar las sales metálicas de sodio, potasio, calcio y aluminio, sales amónicas y amónico-sustituidas, por ejemplo sales de aminas atóxicas como trialkil-aminas, incluyendo a la trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N'-dibencil-etilén-diamina, deshidro-abietil-amina, N,N'-bis-deshidro-abietil-etileno-diamina y otras aminas que han sido usadas para formar sales con la bencil-penicilina.

Otros compuestos dotados de propiedades particularmente interesantes son aquellos en los que R_4 y R_5 completan conjuntamente un sistema de anillos naftalénicos, R_2 y R_3 son átomos de hidrógeno y R_1 es un grupo alcoxi, por ejemplo un grupo metoxi.

Un método de separación de compuestos de este tipo, mediante un anhídrido de un cloro-carbonato de alquilo, comprende la mezcla de un ácido de fórmula general



con el cloro-carbonato de alquilo y una amina alifática o terciaria, tal como trietil-amina, en un disolvente anhidro, inerte y preferiblemente mezclado con agua, tal como el dioxano y, si se desea, una pequeña cantidad de acetona pura y seca. A esta solución del anhídrido se le añade una solución enfriada de ácido 6-amino-penicilánico y amina terciaria, por ejemplo trietil-amina, en un disolvente tal como agua, para formar la sal amónica sustituida del producto deseado; luego puede extractarse la mezcla a un pH alcalino, con un disolvente inmiscible en agua, como el éter, para separar los materiales iniciales que no han reaccionado. El producto que queda en la fase acuosa es convertido en ácido libre, preferiblemente en frío, bajo una capa de éter, mediante la adición de un ácido mineral diluido; a continuación se extrae el ácido libre en un disolvente orgánico neutro inmiscible en agua, que puede ser éter, lavándose el extracto con agua y secándose luego. El producto contenido en el extracto etéreo, en su forma de ácido libre, es luego convertido en cualquier sal metálica o amínica mediante tratamiento con la base apropiada, por ejemplo con una amina libre tal como la base de procaína o una solución de 2-etil-exanoato potásico en n-butanol seco; estas sales son ordinariamente insolubles en disolventes como el éter y pueden recuperarse en forma pura mediante simple filtración.

Otro método de preparación de una solución etérea de la forma ácida de un compuesto de este tipo comprende la elaboración de una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico y bicarbonato sódico y la ulterior adición del cloruro ácido; a continuación se extrae la mezcla con éter, para separar los materiales iniciales que no han reaccionado o se han hidrolizado; se acidula la solución y se extrae la forma de ácido libre del producto en éter. Este extracto etéreo es secado, por ejemplo con sulfato sódico anhidro, y se separa el agente secador, quedando una solución etérea seca de la que se aísla con facilidad el producto, preferiblemente en forma de una sal insoluble en éter, como la sal potásica. Este procedimiento se emplea cuando el cloruro ácido reacciona con una amina primaria más rápidamente que con el agua; en este procedimiento el cloruro ácido puede ser sustituido por una cantidad equimolar del correspondiente bromuro o anhídrido ácidos.

En el caso en que el cloruro ácido reaccione más rápidamente con agua que el ácido 6-amino-penicilánico, es necesario usar unas condiciones anhidras; así, el ácido 6-amino-penicilánico y la trietil-amina se mezclan con un disolvente anhidro, por ejemplo acetona, cloroformo o bicloruro de metileno, añadiéndose a todo ello el cloruro ácido en el mismo disolvente; luego se acidula la mezcla y se separa la parte acuosa, seguidamente se trata la capa disolvente con una solución de bicarbonato sódico o potásico y se separa y concentra la capa de bicarbonato acuoso para aislar la sal sódica o potásica de la penicilina.

Como en los procedimientos anteriores, es conveniente elegir unas condiciones de reacción suficientemente moderadas par evitar la descomposición de los productos obtenidos. Es satisfactorio añadir una solución acuosa de una sal del ácido 6-amino-penicilánico a una solución del agente acilante en disolvente inerte y, preferiblemente, en un disolvente inerte que sea mezclado con agua, tal como acetona o dimetil-formamida; los autores recomiendan una vigorosa agitación cuando se halla más de una fase presente.

Al terminar la reacción se aíslan los productos mediante las técnicas, ya clásicas, usada con bencil-penicilina y fenoxi-metil-penicilina. Así, el producto puede ser extraído en éter dietílico o n-butanol con un pH ácido y luego recuperarse mediante liofilización o mediante conversión en una sal insoluble en disolventes adecuados, como por neutralización con una solución en n-butanol de 2-etil-exanoato sódico o potásico, o bien puede precipitarse el producto de una solución acuosa en forma de una sal insoluble en agua de una amina, o recuperarse directamente mediante liofilización, preferiblemente en forma de una sal sódica o potásica.

Cuando se formule como sal trietil-amínica, el producto es convertido en la forma de ácido libre y, desde éste, en otras sales. El cuidadoso tratamiento de tal compuesto trietil-amínico en agua con hidróxido sódico lo convierte en la sal sódica y la trietil-amina puede separarse mediante extractado, por ejemplo con tolueno. El tratamiento de la sal sódica convierte al compuesto en la forma ácida, que puede transformarse en otras sales aminas, por ejemplo procaína, mediante reacción con la base amina. Las sales así formadas son aisladas por liofilización o, si el producto es insoluble, por filtración.

Un método de aislamiento del producto en forma de sal potásica cristalina comprende el extractado del mismo de una solución acuosa ácida (por ejemplo a un pH 2) en éter di-etílico, el secado del éter y la adición, por lo menos, de un equivalente en una solución concentrada de 2-etil-exanoato potásico en n-butanol seco. La sal potásica forma precipitados, ordinariamente en forma cristalina, y se recoge por filtración o decantación⁵⁹⁶.

⁵⁹⁶ La memoria se completa con más de una treintena de ejemplos, a través de los cuales se establecen métodos para lograr diversos preparados: 3,5-dinitro-fenil-penicilina (sal dibencil-amina), 2-cloro-fenil-penicilina (sal potásica), o-tolil-penicilina (sal potásica), 4-hidroxi-fenil-penicilina (sal potásica), 3,4,5-trimetoxi-fenil-penicilina (sal potásica), p-tolil-penicilina (sal potásica), 4-cloro-fenil-penicilina (sal potásica), 3,4-dicloro-fenil-penicilina (sal dibencil-amina), 3-nitro-p-fenil-penicilina (sal dibencil-amina), 2-hidroxi-fenil-penicilina (sal sódica), 4-etoxi-fenil-penicilina (sal potásica), 2,6-dimetoxi-fenil-penicilina (sal potásica), 2,6-dimetoxi-fenil-penicilina (sal sódica), 2,6-dimetoxi-fenil-penicilina (sal procaínica), 2,6-dimetoxi-fenil-penicilina (sal N,N'-dibencil-etilén-diamina), 2,4,6-trimetil-fenil-penicilina (sal potásica), 2,6-dicloro-fenil-penicilina (sal potásica), 2,6-dicloro-fenil-penicilina (sal potásica), 2,6-di-n-butoxi-fenil-penicilina (sal sódica), 2,6-dibencil-oxifenil-penicilina (sal sódica), 2,3,6-trimetoxi-fenil-penicilina (sal sódica), 2,4,6-trimetoxi-fenil-penicilina (sal sódica), 2,4,6-tribromo-fenil-penicilina (sal sódica), 2,6-di-n-propoxi-fenil-penicilina (sal sódica), 2,6-dimetoxi-4-metil-fenil-penicilina (sal sódica), 6-etoxi-2-metoxi-fenil-penicilina (sal sódica), 2-metoxi-1-naftil-penicilina (sal sódica), 4,6-dietil-2-metoxi-fenil-penicilina (sal sódica), 1-naftil-penicilina (sal sódica), 2-naftil-penicilina (sal sódica), 9-naftil-penicilina (sal sódica), 2-etoxi-1-naftil-penicilina (sal sódica), 2-n-propoxi-1-naftil-penicilina (sal sódica) y 2-n-butoxi-1-naftil-penicilina (sal sódica).

Nos ocupamos del primero de ellos, 3,5-dinitro-fenil-penicilina (sal dibencil-amina): a 1,56 g. (0,0185 moles) [los autores utilizan el término 'molécula-gramo'] de bicarbonato sódico disuelto en 10 ml. de agua, en un baño de hielo, se añadió 1,0 g. (0,00463 moles) de ácido 6-amino-penicilánico. Cuando se hubo disuelto el ácido, se agitó la solución con 1,09 g. (0,0046 moles) de cloruro de 3,5-dinitro-benzóilo en 40 ml. de cloroformo, durante 15 minutos. Se separó la capa acuosa, se lavó con cloroformo y luego se ajustó a un pH de 5-6 con ácido acético glacial. A continuación se añadió una

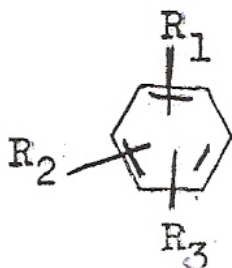
Apenas unos días después, el 8 de junio de 1960, esta misma empresa británica, *Beecham Research Laboratories Limited*, presenta ante el registro español de patentes un expediente relativamente similar, para proteger, por veinte años, su invención sobre un “Procedimiento para la preparación de nuevas penicilinas y sales atóxicas de las mismas”⁵⁹⁷, desarrollado por los británicos Frank Peter Doyle, John-Herbert-Charles Nayler y George Newbolt Rolinson.

Esta invención se refiere a un nuevo grupo de penicilinas formadas por penicilinas de alquilo o bencilo alfa-sustituidas. Estos compuestos se presentan como agentes antimicrobianos, como complementos dietéticos en los forrajes, en el tratamiento de la mastitis del ganado y como agentes terapéuticos para aves y animales, incluido el hombre, para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias gram-positivas. Los compuestos objeto de esta patente, además de su actividad antimicrobiana, son resistentes a la destrucción por ácidos y conservan un nivel terapéutico efectivo durante un amplio período de tiempo en la corriente sanguínea.

Estos nuevos compuestos son penicilinas que tienen por fórmula general,



y las sales atóxicas de las mismas⁵⁹⁸, donde R es un grupo fenilo, fenilo sustituido o un grupo alcoxi, aralcoxi, alquiltio o alcanóiloxi; cuando R es un grupo alquilo, puede serlo de cadena recta o ramificada, saturado o no saturado. Alternativamente, R puede tener la fórmula general que se indica bajo estas líneas



R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y cada uno de ellos es un átomo de hidrógeno o un grupo nitro, dialquil-amino, alcanóilo, alquilo, cloro, bromo, alcoxi o un sulfamilo.

solución de 1,0 g. (0,00506 moles) de dibencil-amina en 200 ml. de agua acidulada a un pH 5 con ácido acético. La sal dibencil-amina de 3,5-dinitro-fenil-penicilina precipitó en forma cristalina con la adición de un poco de ácido y fue recogida, mezclada con 5 ml. de acetona seca y secada, mostrando un peso de 1,5 g. y un punto de fusión de 120°-123° C. Inhibió *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1,24 mcg./ml.

⁵⁹⁷ AHOEPM, patente 258.755; la memoria descriptiva consta de veinte página escritas a máquina y por una sola cara, firmadas en Madrid, a 8 de junio de 1960. Como domicilio social de la empresa figura Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente tiene prioridad británica bajo solicitudes 19.756/59 de 9 de julio de 1959 y 24.337/59 de 15 de julio de 1959. La patente española fue concedida el 15-IX-1960 y publicada el 16-XI-1960.

⁵⁹⁸ Las sales atóxicas incluyen, entre otras, sales metálicas como las de sodio, potasio, calcio y aluminio; sal amónica y sal amónica sustituida; sales de aminas atóxicas como trialquil-aminas, incluyendo trietil-amina, procaína, dibencilo, N-bencil-beta-fenil-amina, 1-efén-amina, N,N'-bis-dibencil-etilén-diamina, dehidro-abietil-amina, N,N'-bis-dehidro-abietil-amina y otras aminas que se han empleado para formar sales con bencil-penicilina.

El núcleo de este procedimiento es hacer reaccionar el ácido 6-amino penicilánico, preferentemente en forma de sal neutra, como sal sódica o trietil-amínica, con un cloruro ácido de fórmula general $X-R.CH.CO.Cl$, en la cual R se corresponde con un grupo fenilo, fenilo sustituido o alquilo y X representa un átomo de halógeno o un grupo alcoxilo, aralcoxilo, alquiltio o alcanoiloxi, o sus equivalentes funcionales, como un agente acilador para un grupo amino primario⁵⁹⁹.

Un método para preparar este tipo de compuestos parte del anhídrido mixto del cloro-carbonato de alquilo, consiste en mezclar un ácido (cuyo cloruro ya se ha definido), con el cloro-carbonato de alquilo y una amina alifática, como la trietil-amina, en un disolvente anhidro, inerte y preferiblemente miscible en agua, como dioxano y, si se desea, una pequeña cantidad de acetona seca y pura, durante *ca.* 30 minutos en frío, por ejemplo a 4° C. A esa solución del anhídrido mixto se le agrega una solución enfriada de ácido 6-amino-penicilánico y amina terciaria, por ejemplo trietil-amina, en un disolvente como agua. La mezcla de reacción se agita durante una hora, aproximadamente, para formar la sal amínica sustituida del producto deseado. Puede extraerse la mezcla en un pH alcalino con un disolvente inmiscible en agua, como éter, para separar los productos iniciales que no hayan reaccionado. El producto en la fase acuosa se convierte en ácido libre, preferentemente en frío bajo una capa de éter, por adición de ácido mineral diluido; el ácido libre se extrae entonces en un disolvente orgánico neutro, inmiscible en agua, tal como éter, lavándose el extracto rápidamente con agua en frío y secándolo a continuación. El extracto etéreo en forma de ácido libre se convierte entonces en cualquier sal metálica o amínica que se desee, por tratamiento de la base apropiada, por ejemplo una amina libre o una solución de 2-etil-hexanoato de potasio en n-butanol seco. Estas sales suelen ser insolubles en disolventes como el éter y pueden ser recuperadas en forma pura por simple filtración.

Otro método para preparar una solución etérea de la forma ácida de un compuesto del tipo que nos ocupa incluye la preparación de una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico y bicarbonato sódico, agregando el cloruro ácido y agitando enérgicamente, a la temperatura ambiente, durante un tiempo de 20 a 60 minutos; a continuación se extrae la mezcla con éter para separar los reactivos iniciales que no han reaccionado o han sido hidrolizados. La solución se acidula a pH 2 y la forma de ácido libre del producto se extrae con éter; este extracto etéreo se seca con sulfato sódico anhídrido, se separa el agente secante y se obtiene una solución etérea seca de la cual se aísla fácilmente el producto, preferiblemente en forma de sal insoluble en éter, tal como la sal potásica.

Como algunas de las sustancias antibióticas obtenidas por este método son compuestos relativamente inestables es conveniente elegir, como en los procedimientos anteriores, unas condiciones de reacción que sean suficientemente moderadas para evitar que se descompongan. Al concluir la reacción, los productos se aíslan, valiéndose de técnicas utilizadas con bencil-penicilina y fenoxi-metil-penicilina; así pues el producto se puede extraer en disolvente dietílico o n-butanol a pH ácido, o recuperarse por liofilización, en forma de una sal sódica o potásica.

Cuando se adopta la forma de sal trietil-amínica, el producto se convierte en la forma de ácido libre y luego en otras sales; así pues, el tratamiento de tal compuesto dietil-amínico en agua con hidróxido sódico lo convierte en la sal sódica o en la sal

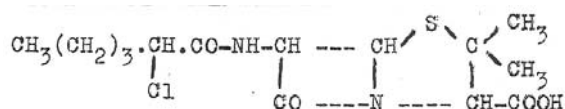
⁵⁹⁹ Tales equivalentes comprenden los correspondientes bromuros de ácido carboxílico, anhídridos ácidos y los anhídridos mixtos con otros ácidos carboxílicos, incluidos los mono-ésteres y, en particular, ésteres alifáticos inferiores del ácido carbónico.

trietil-amínica, pudiéndose eliminar la trietil-amina por extracción con tolueno. El tratamiento de la sal sódica con un ácido fuerte acuoso convierte el compuesto en la forma ácida, que puede transformarse en otras sales amínicas, por ejemplo procaína, por reacción con la base amínica. Las sales así formadas se aíslan por liofilización o, si el producto es insoluble, por filtración.

Un método para aislar el producto como sal potásica cristalina consiste en extraerlo de una disolución acuosa acidificada (por ejemplo a pH 2), con éter dietílico, evaporando el éter y agregando, al menos, un equivalente de una solución concentrada de 2-etil-hexanoato potásico en n-butanol seco. La sal potásica forma precipitados, generalmente en forma cristalina, y es recogida por filtración o decantación. Cuando un cloruro ácido, un bromuro ácido o un anhídrido ácido se utiliza en este tipo de procedimiento, se le prepara a partir del correspondiente ácido, según las técnicas descritas en la literatura referente al ácido fenil-acético⁶⁰⁰.

El 22 de marzo de 1961, la empresa inglesa *Beecham Research Laboratories Limited* presenta, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por

⁶⁰⁰ Los autores proponen más de una veintena de ejemplos con los que lograr los productos a los que se alude en esta patente; concretamente proporcionan un método de obtención de alfa-cloro-pentil-penicilina (sal sódica), de fórmula

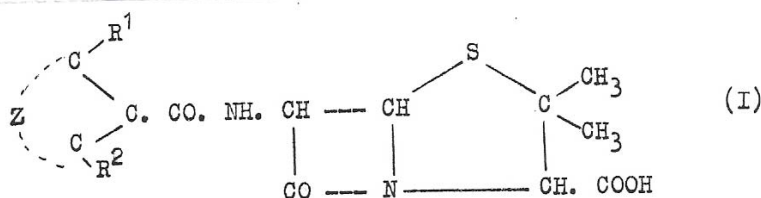


del que nos ocupamos a continuación: una solución de alfa-cloro-hexil-cloruro (338 mg.) en acetona seca (2 ml.), se adicionó, gota a gota, durante 10 minutos, a una solución agitada de ácido 6-amino-penicilánico (433 mg., pureza aproximada 70%) en un bicarbonato sódico acuoso al 3% (17 ml.) y acetona (13 ml.). Una vez completada la adición, la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una hora y luego se extrajo con éter (30 ml. en 3 porciones), reteniendo solo la fase acuosa. Esta solución acuosa se cubrió con butanol (5 ml.) y se ajustó a pH 2 con ácido clorhídrico 1 N. Después de separadas las capas, la fase acuosa se extrajo con dos porciones de 2,5 ml. de butanol, ajustando el pH a 2 cada vez. Las soluciones de butanol combinadas (que en este momento contenían el ácido penicilínico libre) se lavaron con agua (3 x 2 ml.) y luego se volvieron a lavar con un agua (10 ml.) a la que se añadió suficiente bicarbonato sódico al 3% para llevar la fase acuosa a un pH 7. La solución de butanol se volvió a extraer con dos porciones de 5 ml. de agua cada una, a las cuales se agregó la suficiente solución de bicarbonato para producir una fase acuosa de pH 7. Las soluciones acuosas combinadas fueron lavadas con éter (20 ml.) y evaporadas a baja temperatura y presión para producir la sal sódica cruda de alfa-cloro-pentil-penicilina, la cual, después del secado en un desecador al vacío, se obtuvo en forma de polvo amarillo pálido (129 mg.); su pureza se estimó en un 77%. La estabilidad hacia los ácidos se desprende del hecho de que el 92% de la penicilina permaneció inalterable después de que una solución a pH 2 había sido mantenida durante una hora a 35° C. La penicilina inhibió *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0,12 mcg./ml.

De manera similar, la memoria descriptiva se ocupa de la obtención de alfa-cloro-heptil-penicilina (sal sódica), alfa-cloro-butil-penicilina (sal sódica), alfa-bromo-iso-butil-penicilina (sal sódica), alfa-cloro-pentil-penicilina (sal potásica), alfa-bromo-propil-penicilina (sal potásica), alfa-bromo-pentil-penicilina (sal potásica), alfa-bromo-etil-penicilina (sal sódica), alfa-bromo-beta-metoxi-propil-penicilina (sal sódica), alfa-bromo-pentil-penicilina (sal sódica), alfa-metoxi-bencil-penicilina (sal dibencil-amínica), alfa-fluoro-bencil-penicilina (sal potásica), alfa-etoxi-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-propoxi-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-iso-propoxi-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-n-butoxi-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-iso-butoxi-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-sec-butoxi-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-ciclo-hexiloxi-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-etil-tío-bencil-penicilina (sal sódica), alfa-bromo-bencil-penicilina (sal potásica), o-etoxi-bencil-penicilina (sal sódica) y alfa-etil-tío-bencil-penicilina (sal sódica).

veinte años, un "Proceso para la preparación de nuevas penicilinas"⁶⁰¹, desarrollado por los británicos Frank Peter Doyle y John-Herbert-Charles Nayler, con el que obtener productos de potente actividad antibacteriana que, además, presenten resistencia a la destrucción por penicilinas y, algunos de ellos, sean estables a la acción de los ácidos.

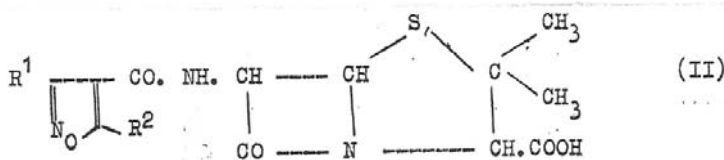
Estas nuevas penicilinas tienen como fórmula general



Z es el residuo de un sistema de anillos heterocíclicos sustituidos o sin sustituir. / R^1 y R^2 son iguales o diferentes, siendo cada uno de ellos un grupo alquilo, arilo, acilo, aralquilo, ciclo-alquilo, heterocíclico, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, alquitio, araltio o aralquitio, que pueden ser sustituidos, o un átomo halógeno. / R^1 o R^2 pueden formar parte de un sistema cíclico, sustituido o no, unido al anillo que contiene Z .

La sales de estos compuestos, que por supuesto han de ser atóxicas, incluyen sales metálicas tales como de potasio, sodio, calcio y aluminio, sales amónicas y amónicas sustituidas, como podrían ser las sales de aminas atóxicas tales como las trietil-aminas, incluyendo trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efen-amina, N,N'-dibencil-etilén-diamina y otras aminas que se han empleado para formar sales con bencil-penicilina.

Una clase preferente de compuestos tiene como fórmula general

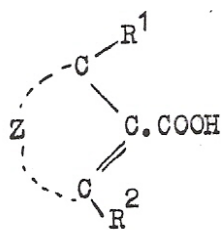


R^1 y R^2 son iguales o diferentes, siendo cada grupo un alquilo, arilo, acilo, aralquilo, ciclo-alquilo, heterocíclico, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, alquitio, ariltio o aralquitio, que pueden ser sustituidos, o un átomo de halógeno.

Son particularmente interesantes, dentro de esta clase, los compuestos en los que uno de los grupos R^1 y R^2 es un grupo fenilo, sustituido o sin sustituir, y el otro un grupo alquilo inferior.

El proceso de producción de estas sales consiste en hacer reaccionar el ácido 6-amino-penicilánico, o una solución que lo contenga, con un cloruro, bromuro o anhídrido, derivados de un ácido carboxílico de fórmula general

⁶⁰¹ AHOEPM, patente 265.959; la memoria descriptiva consta de veintiuna hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 22-III-1961; la memoria tiene, como referentes las patentes británicas 11412/60 de 31-III-1960 y 25049/60 de 18-VII-1960. La empresa reseña como su domicilio Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente, de invención, fue concedida el 20-V-1961 y publicada el 1-VIII-1961.



(III) Z, R¹ y R² tienen los significados definidos líneas arriba.

Puede hacerse reaccionar un anhídrido de un ácido de formula general (III) con el cloro-carbonato de alquilo y un hidrocarburo terciario o amina alifática, tal como la trietil-amina, en un disolvente anhidro, inerte y preferentemente miscible en agua, como el dioxano; es posible añadir, si se desea, una cantidad de acetona pura y seca. A esta solución de anhídrido se le agrega una solución de ácido 6-amino-penicilánico e hidrocabonil-amina terciaria, por ejemplo trietil-amina, en un disolvente tal como el agua, para formar la sal amónica sustituida del producto deseado. La mezcla puede extractarse luego a pH alcalino con un disolvente inmiscible con agua, como por ejemplo éter, para separar los reactivos iniciales que no han reaccionado.

El producto, que se encuentra en la fase acuosa, se transforma en ácido libre, preferiblemente en frío bajo una capa de éter, mediante la adición de un ácido mineral diluido. El ácido libre es luego extraído en un disolvente orgánico neutro inmiscible en agua, tal como el éter; se lava el extracto con agua y luego se seca.

El producto contenido en el extracto etéreo en forma de ácido libre es convertido, luego, en cualquier sal metálica o amina mediante tratamiento con la base deseada, por ejemplo con una amina libre, como base de procaína o una solución de 2-etil-exanoato potásico en n-butanol seco. Estas sales son insolubles ordinariamente en disolventes tales como el éter y pueden recuperarse en forma pura mediante simple filtración.

Otro medio de preparación de una solución etérea de la forma ácida de un compuesto de este tipo comprende la formación de una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico y bicarbonato sódico y la adición ulterior del cloruro ácido. Seguidamente se extrae la mezcla con éter para separar los materiales iniciales que no han reaccionado o están hidrolizados; luego se acidifica la solución y se extrae la forma de ácido libre. Este extracto etéreo es secado, por ejemplo con sulfato sódico anhidro, y el agente secante es retirado quedando una solución etérea seca de la que se aísla fácilmente el producto, preferentemente en forma de una sal insoluble en éter, tal como la sal potásica. Este procedimiento se usa cuando el cloruro ácido reacciona con una amina primaria más rápidamente que con el agua, hecho que se puede determinar por simple ensayo⁶⁰².

Dado que algunas de las sustancias antibióticas obtenidas mediante este proceso son compuestos relativamente inestables, es conveniente elegir las condiciones de reacción de forma tal que sean lo suficientemente moderadas para evitar su descomposición. Un factor a tener en cuenta es la temperatura elegida para el proceso,

⁶⁰² En el caso en que el cloruro ácido reaccionara más rápidamente con agua que el ácido 6-amino-penicilánico, es necesario usar condiciones anhidras. Así, el ácido 6-amino-penicilánico y la trietil-amina se mezclan con un disolvente anhidro, por ejemplo acetona, cloroformo o dicloruro de metileno y seguidamente se agrega el cloruro ácido en el mismo disolvente. Luego se acidifica la mezcla con una solución de bicarbonato sódico o potásico y se separa la capa de bicarbonato acuoso, concentrándose para aislar la sal sódica o potásica de la penicilina.

ésta no debe rebasar los 30° C, en muchos casos la temperatura ambiente será la adecuada. Se ha de evitar el uso de solución acuosa en condiciones fuertemente ácidas o alcalinas en este proceso, por lo que es conveniente llevarlo a cabo a un pH entre 6 y 9, lo que se consigue mediante el empleo de un amortiguador, por ejemplo una solución de bicarbonato sódico o de fosfato sódico. Además del empleo de medios acuosos para la reacción, incluyendo caldos de fermentación filtrados o soluciones acuosas de ácido 6-amino-penicilánico crudo, pueden utilizarse disolventes orgánicos, por ejemplo dimetil-formamida, dimetil-acetamida, acetona, dicloruro de metileno, metil-isobutil-cetona y dioxanos. Muchas veces es conveniente añadir una solución acuosa de una sal del ácido 6-amino-penicilánico a una solución del agente acilante en un disolvente inerte que sea miscible con agua, tal como acetona o dimetil-formamida.

Al terminar la reacción son aislados los productos, si así se desea, mediante las técnicas empleadas con bencil-penicilina y fenoxi-metil-penicilina⁶⁰³. Para facilitar la aplicación práctica de este método de acilación, los autores proporcionan tres ejemplos con los que preparar, respectivamente, 4:6-dimetil-alfa-piron-5-il-penicilina (sal sódica), 2:4:5-trifenil-3-fruril-penicilina (sal sódica) y 2,4-dimetoxi-3-quinolil-penicilina⁶⁰⁴.

El 25 de septiembre de 1963, *Beecham Research Laboratories Limited* presentaría, ante el registro español, el primer certificado de adición para esta patente, "Mejoras en el objeto de la patente principal nº 265.659 por proceso para la preparación de nuevas penicilinas"⁶⁰⁵; en este caso atribuido, únicamente, al trabajo de John-Herbert-Charles Nayler.

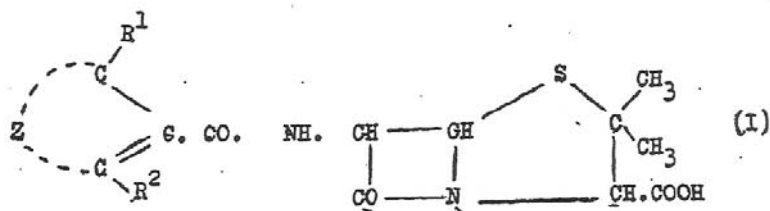
Los autores señalan ahora que ciertos elementos que entran en la fórmula general del compuesto penicilínico de referencia (I), además de poseer todas las

⁶⁰³ El producto puede extractarse en éter dietílico o n-butanol, a un pH ácido y recuperarse luego mediante liofilización o conversión a una sal insoluble, como por ejemplo mediante la neutralización con una solución en n-butanol de 2-etil-exanoato sódico o potásico, o bien puede precipitarse el producto de una solución acuosa tal como una sal insoluble en agua de una amina, o recuperarse directamente mediante liofilización, preferentemente en forma de una sal sódica o potásica.

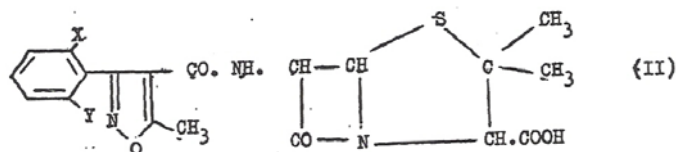
⁶⁰⁴ A modo de ejemplo, nos ocupamos del primero de ellos, formación de 4:6-dimetil-alfa-piron-5-il-penicilina (sal sódica): se añadió lentamente una solución de cloruro de iso-dehidro-cetilo (7,5 g.) en cloroformo seco (60 ml.) a una mezcla helada y agitada de ácido 6-amino-penicilánico (8,64 g.), trietil-amina (11 ml.) y cloroformo seco (60 ml.); la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante tres horas. Se concentró al vacío y a temperatura ambiente; a continuación se agitó la mezcla con 120 ml. de agua y se separaron las capas formadas. La fase acuosa se llevó a pH 7 mediante la adición de bicarbonato sódico y se lavó con éter (2 x 100 ml.), seguido de butanol (2 x 30 ml.); a continuación se cubrió con butanol (20 ml.) y se aciduló a un pH 3 con ácido clorhídrico 1 N. Se separaron las capas y se extrajo la fase acuosa con dos porciones de 20 ml. de butanol, los extractos de butanol (que en esta fase contenían el ácido penicilínico libre) se combinaron; fueron lavados con 25 ml. de agua y neutralizados luego con la adición de 20 ml. de una solución de bicarbonato sódico al 8%, con fuerte agitación. Se separaron las capas y se evaporó la fase acuosa a baja temperatura y presión, quedando la sal sódica impura de 4:6-dimetil-alfa-pirón-5-il-penicilina en forma de un sólido marrón, higroscópico, que fue secado finalmente en un desecador al vacío; la producción fue de 3,55 g. El producto inhibió al *Staphylococcus* Oxford a una concentración de 5 mcg./ml.

⁶⁰⁵ AHOEPM, patente 291.973; la memoria descriptiva consta de doce páginas mecanografiadas, firmadas en Madrid a 25 de septiembre de 1963. El expediente se corresponde con la solicitud presentada ante la Administración británica el 17-X-1962 (registro 39.329/62). La empresa está domiciliada en Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente española fue concedida el 30-X-1963 y publicada el 16-XII-1963.

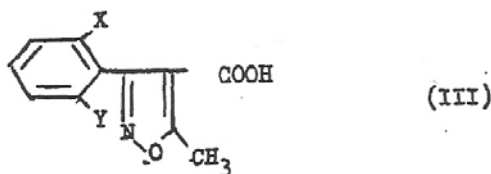
propiedades deseables de estas penicilinas, son capaces de producir niveles sanguíneos muy elevados en el hombre.



Por lo tanto, esta patente proporciona nuevas penicilinas, de fórmula general (II), y sales atóxicas de las mismas⁶⁰⁶, en cuya fórmula X e Y son iguales o diferentes, siendo cada una de ellas un átomo de cloro, bromo o flúor.



El procedimiento para obtener estos nuevos compuestos es hacer reaccionar ácido 6-amino-penicilánico, o un licor que lo contenga, con un cloruro, bromuro, anhídrido o derivado de un ácido carboxílico, de fórmula general (III), en la que X e Y son un átomo de cloro, bromo o flúor.



Un método de preparación de estos productos es por medio de un anhídrido mezclado con un cloro-carbonato alquílico, que comprende la mezcla de un ácido de fórmula general (III) con el cloro-carbonato alquílico y un hidrocarburo o amina alifática terciarios, como trietil-amina, en un disolvente anhidro, inerte y preferiblemente mezclable con agua, tal como el dioxano y, si se desea, una pequeña cantidad de acetona pura y seca. A esta solución del anhídrido mezclado se le añade una solución enfriada de ácido 6-amino-penicilínico y amina hidro-carbonila terciaria, es decir trietil-amina, en un disolvente como agua, para formar la sal amónica sustituida del producto. Luego, si se desea, puede extractarse la mezcla a un pH alcalino con un disolvente inmiscible en agua, tal como el éter, para separar los materiales iniciales que no hayan reaccionado. A continuación se convierte el producto de la fase acuosa en ácido libre, preferiblemente en frío, bajo una capa de éter, mediante la adición de ácido mineral diluido. Inmediatamente se extrae el ácido libre en un disolvente orgánico neutro, inmiscible en agua, como el éter, se lava el extracto con agua y se seca. Seguidamente, el producto contenido en el extracto etéreo en su forma de ácido libre es convertido en cualquier sal metálica o amínica mediante tratamiento con la base

⁶⁰⁶ Las sales atóxicas incluyen sales metálicas tales como las potásicas, sódicas, cálcicas y aluminicas, amónicas y amónicas sustituidas, por ejemplo sales de aminas atóxicas como trietil-aminas, incluyendo trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N-dibencil-etileno-diamina, 1-dehidro-abietil-amina, N,N-bis-dehidro-abietil-etileno-diamina y otras aminas que hayan sido utilizadas para formar sales con bencil-penicilina.

apropiada, por ejemplo una amina libre, como base de procaína, o una solución de 2-etil-exanoato potásico en n-butanol seco. Estas sales son ordinariamente insolubles en disolventes como el éter y pueden recuperarse en forma pura mediante simple filtración.

Otro método de preparación de una solución etérea de la forma ácida de un compuesto del tipo de los propuestos en esta patente, comprende la preparación de una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico y bicarbonato sódico y la ulterior adición del cloruro ácido. Luego se extracta la mezcla con éter, para separar los materiales iniciales que no han reaccionado o han sido hidrolizados. A continuación se acidifica la solución y se extracta, con éter, la forma de ácido libre del producto. Este extracto etéreo es secado, por ejemplo con sulfato sódico anhidro, y se separa el agente secador para dejar una solución etérea seca a partir de la cual se aísla fácilmente el producto, preferiblemente en forma de una sal insoluble en éter, tal como la sal potásica. Este procedimiento se emplea cuando el cloruro ácido reacciona con una amina primaria más rápidamente que con el agua; en este procedimiento el cloruro ácido puede ser sustituido por una cantidad equimolar del correspondiente bromuro ácido o anhídrido ácido.

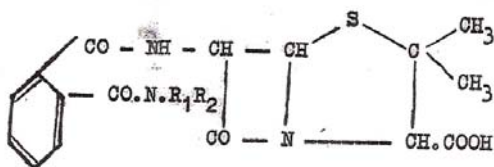
En el caso de que el cloruro ácido reaccione más rápidamente con el agua que con el ácido 6-amino-penicilánico, es necesario usar condiciones anhidras; así, el ácido 6-amino-penicilánico y la trietil-amina son mezclados con un disolvente anhidro, por ejemplo acetona, cloroformo o dicloruro de metileno y se añade a ello el cloruro ácido en el mismo disolvente. Luego se acidifica la mezcla y se separa la capa acuosa. A continuación se trata la capa disolvente con una solución de bicarbonato sódico o potásico, se separa la capa de bicarbonato acuosa y se concentra para aislar la sal sódica o potásica de la penicilina.

Como algunas de estas sustancias antibióticas obtenidas por este procedimiento son compuestos relativamente inestables, que experimentan fácilmente cambios químicos cuyo resultado es la pérdida de actividad antibiótica, es deseable elegir unas condiciones de reacción que sean suficientemente moderadas para evitar su descomposición. La temperatura elegida no debe exceder de 30° C, en muchos casos una temperatura adecuada es la ambiente. Es conveniente llevar a cabo el proceso a un pH de 6-9, lo cual puede conseguirse usando un neutralizador a base de fosfato sódico. Además del empleo de medios acuosos para la reacción, como caldos de fermentación filtrados o soluciones acuosas de ácido 6-amino-penicilánico crudo, pueden utilizarse disolventes orgánicos, por ejemplo dimetil-formamida, dimetil-acetamida, cloroformo, acetona, dicloruro de metileno, cetona metil-isobutílica y dioxano. Suele ser satisfactorio añadir una solución acuosa de una sal de ácido 6-amino-penicilánico a una solución del agente acilante en un disolvente inerte que sea inmisible en agua, tal como cetona o formamida dimetílica. También es conveniente una agitación enérgica, cuando se halla presente más de una fase⁶⁰⁷.

⁶⁰⁷ El autor propone algunos ejemplos relacionados con este compuesto; nos ocupamos, a modo ilustrativo, de la formación de la sal sódica de 3-(2',6'-dicloro-fenil)-5-metil-4-metil-4-isoxazolil-penicilina: se ajustó a un pH 7,2 una suspensión de ácido 6-amino-penicilánico (52,5 g.) en agua (484 ml.) mediante la adición de hidróxido sódico 1 N y se trató la solución resultante con otra solución de cloruro de 3-(2',6'-dicloro-fenil)-5-metil-isoxazol-4-carbonilo (70,5 g.) en acetona isobutil-metílica (76 ml.). Se agitó vigorosamente la mezcla durante 1½ hora y luego se filtró; se separaron las capas y se agitó la de acetona isobutil-metílica con salmuera saturada. Después de separar las capas, se filtró la fase de cetona isobutil-metílica y se trató con 125 ml. de solución 2 N de 2-etilaxaoto [*sic* por hexanoato] sódico en isopropanol para originar una solución clara. Se separó la sal sódica de 3-(2',6'-dicloro-fenil)-5-metil-4-isoxazolil-penicilina (63,9 g.) como mono-hidrato microcristalino blanco, que fue recogida por

Los productos obtenidos fueron administrados oralmente a grupos de voluntarios, siendo la dosis de 500 mg. en cada caso, luego se tomaron muestras de sangre a intervalos regulares y las concentraciones de antibióticos obtenidas en el suero se midieron por bioensayo. Los resultados medios obtenidos muestran que, cada una de las nuevas penicilinas, presentan niveles de suero superiores y/o más prolongados que los logrados con cloxacilina.

Con fecha 2 de octubre de 1961, la empresa inglesa *Beecham Research Laboratories Limited* presentó un expediente para patentar, en España y por veinte años, un procedimiento de su invención relativo a un "Proceso para la preparación de penicilinas de fórmula



y sus sales atóxicas"⁶⁰⁸, del que son responsables Ivon Gaston Perrson, un investigador de nacionalidad canadiense⁶⁰⁹ y Lee C. Cheney, de origen norteamericano.

Este procedimiento trata de la obtención de nuevos compuestos sintéticos, derivados de la penicilina, útiles como agentes antibacterianos, como complementos nutritivos en los alimentos de los animales, como agentes para el tratamiento de la mastitis en el ganado vacuno y como productos terapéuticos en aves y otros animales, incluyendo el hombre, en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias gram-positivas. De acuerdo con este procedimiento, se obtienen penicilinas que responden a la fórmula general indicada, y sus correspondientes sales⁶¹⁰

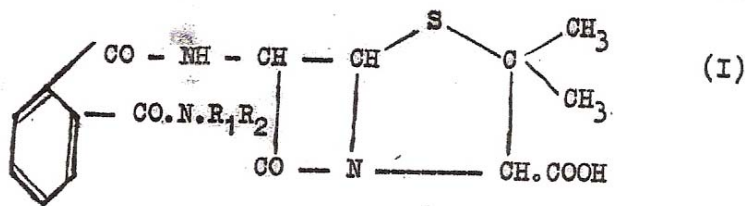
filtración y secado en aire; tenía un punto de descomposición de 214° C; el análisis porcentual observado fue C (44,2%), H (3,8%), N (8,3%) y S (6,6%) para el caso de C₁₉H₁₆Cl₂N₃O₅SN_a.H₂O, que presenta unos valores teóricos de C (44,7%), H (3,5%), N (8,2%) y S (6,3%). El producto inhibió a *Staphylococcus aureus* Oxford a 0,1 mcg./ml. Se obtuvo ácido 3-(2',6'-dicloro-fenil)-5-metil-isoxazolil-4-carboxílico con acetato metílico en metóxido sódico metanólico, seguido del éster resultante. El cloruro ácido se originó del tratamiento del ácido con cloruro de tionilo.

En ejemplos posteriores señala procedimientos para obtener 3-(2',6'-dicloro-fenil)-5-metil-4-isoxazolil-penicilina (ácido libre), sal potásica de 3-(2',6'-dicloro-fenil)-5-metil-4-isoxazolil-penicilina, 3-(2'-cloro-6'-fluoro-fenil)-5-metil-4-isoxazolil-penicilina, 3-(2'-bromo-6'-cloro-fenil)-5-metil-4-isoxazolil-penicilina, 3-(2',6'-difluoro-fenil)-5-metil-4-isoxazolil-penicilina.

⁶⁰⁸ AHOEPM, patente 270.875; la memoria descriptiva, con una extensión de 26 páginas mecanografiadas, queda firmada en Madrid, a 2 de octubre de 1961; como domicilio social de la empresa figura Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente tiene prioridad norte-americana, bajo registros 62.526/60, concedido el 14-X-1960 y 74.489/60, de fecha 8-XII-1960. La patente española fue otorgada el 15-XI-1961 y hecha pública el 1-I-1962.

⁶⁰⁹ En estas mismas fechas, este investigador figura al servicio de una empresa norteamericana, *Bristol-Myers Company* (cf. AHOEPM, patente 275.555).

⁶¹⁰ Las sales que pueden formarse incluyen sales metálicas atóxicas tales como las de sodio, potasio y aluminio, la sal amónica y las amónicas sustituidas, por ejemplo sales de aminas atóxicas tales como tri-(inferior)-alquil-aminas, incluyendo la trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, N"-bis-dehidro-abietil-etilén-diamina, N-(inferior)-alquil-piperidina y otras aminas que se hubieran empleado para formar sales con bencil-penicilina.



R_1 es alquilo o alquenoilo, aralquilo, ciclohexilo o alquilo de cadena recta, terminado por un sistema de anillos heterocíclicos cuando R_2 es hidrogeno. / R_1 y R_2 pueden ser alquilo, alquenoilo o arilo. / R_1 y R_2 , conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están fijados, forman un sistema de anillos heterocíclicos que puede estar sustituido con grupos de alquilos inferiores y tener un anillo bencénico fundido al mismo.

Las penicilinas a las que responde este procedimiento son, preferentemente, aquellas en las que R_1 es un radical alquilo o un radical alquilo inferior⁶¹¹, particularmente n-propilo, iso-propilo, n-amilo, n-butilo y t-butilo. También se incluyen ésteres fácilmente hidrolizados que se convierten en la forma de ácido libre mediante hidrólisis química o enzimática.

Un método de preparación de un compuesto de la presente invención, por medio de un anhídrido mezclado con ácido epoxi- o isobutoxi-carbónico, comprende la mezcla de un ácido ftalámico con clorofornato de isobutilo y una amina alifática terciaria, tal como la trietil-amina, en un disolvente anhidro, inerte o perfectamente mezclable con agua, tal como el p-dioxano y, si se desea, una pequeña cantidad de acetona pura y seca, durante unos 30 minutos en frío, por ejemplo a unos 4° C. A esta solución del anhídrido mezclado se le añade una solución fría de ácido 6-amino-penicilánico y una amina terciaria, por ejemplo trietil-amina en un disolvente, agua por ejemplo. Se agitó la mezcla reactiva durante un período de una hora, aproximadamente, para formar la sal amónica sustituida del producto deseado. Luego se extrae la mezcla a pH alcalino con disolvente inmiscible en agua, tal como el éter, para separar los reactivos iniciales que no han reaccionado. El producto en fase acuosa se convierte en ácido libre, preferiblemente en frío y bajo una capa de éter, mediante la adición de ácido mineral diluido, por ejemplo H_2SO_4 a concentración 5 N y un pH 2. A continuación se extrae el ácido libre en un disolvente orgánico neutro e inmiscible en agua, por ejemplo éter, lavándose el extracto etéreo con agua fría y secándolo luego. Seguidamente se convierte el producto contenido en el extracto etéreo en su forma de ácido libre en cualquier sal metálica o amínica, mediante el tratamiento con la base apropiada, por ejemplo una amina libre, tal como la base de procaina o una solución de 2-etil-hexanoato potásico en n-butanol seco. Estas sales son ordinariamente insolubles en disolventes como el éter y pueden recuperarse en forma pura mediante simple filtración.

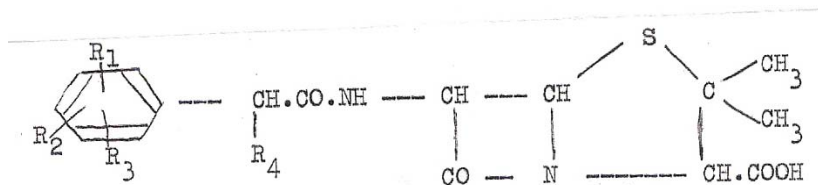
La temperatura elegida para el proceso de preparación no deberá superar los 30° C y, en muchos casos, la temperatura ambiente será adecuada. Es conveniente realizar el proceso a un pH entre 6 y 9, lo cual puede conseguirse mediante el uso de un amortiguador, por ejemplo una solución de bicarbonato sódico o de fosfato sódico. Puede hacerse uso de disolventes orgánicos, por ejemplo dimetil-formamida, dimetil-acetamida, cloroformo, acetona, metil-isobutil-cetona o dioxano; normalmente resulta muy satisfactorio añadir una solución acuosa de una sal de ácido 6-amino-penicilánico a una solución del agente acilante en un disolvente inerte y, preferiblemente, uno que sea

⁶¹¹ Los autores aclaran que el término 'alquilo' se refiere a grupos hidocarburos alifáticos saturados, de cadena recta y ramificada, que tienen de 1 a 12 átomos de carbono, y los grupos 'alquilo inferiores' son grupos alquilos que tienen de 1 a 6 átomos de carbono.

miscible en agua, como acetona o dimetil-formamida. Los autores proponen, mediante una veintena de ejemplos, la preparación de algunos de los productos a los que le es de aplicación este procedimiento⁶¹².

El 2 de julio de 1962, la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* presentó a registro un expediente para proteger, por veinte años, un "Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas"⁶¹³; figuran como inventores Frank Peter Doyle y John-Herbert-Charles Nayler, ambos de nacionalidad inglesa.

Estas nuevas penicilinas, muy próximas a otras registradas por esta misma empresa bajo la autoría de estos mismos autores, se ajusten a estructuras del tipo de la fórmula general⁶¹⁴



R_1 , R_2 y R_3 son iguales -o diferentes- y cada uno de ellos es un átomo de hidrógeno, un grupo nitro, cloro, bromo, hidróxido, alquilo, alcanolóxido o alcóxido. / R_4 es un grupo alcanolóxido, que contiene hasta 6 átomos de carbono.

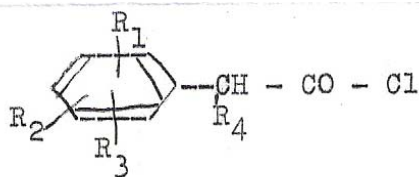
Uno de los compuestos de más interés, entre los pertenecientes a este grupo, es alfa-acetoxi-bencil-penicilina ($R_1, R_2, R_3 = H$ - $R_4 = OCO-CH_3$), que puede existir en dos formas isómeras ópticamente activas: la L(+)-alfa-acetoxi-bencil-penicilina y la D(-)-alfa-acetoxi-bencil-penicilina; estas dos formas son epímeros no enantiomorfos, ya que el ácido 6-amino-penicilánico usado en la síntesis es, de por sí, un compuesto ópticamente activo.

⁶¹² Nos ocupamos del primero de ellos, preparación del ácido N-alil-ftalámico: se mezclaron en un matraz de fondo redondo, de tres cuellos y de un litro de capacidad, 74,0 g. (0,5 moles) de anhídrido ftálico y 300 ml. de benceno; la mezcla se agitó durante 20 minutos y se añadió, a gotas, una mezcla de alil-amina (0,5 ml., 28,5 g.) en 100 ml. de benceno durante un periodo de ½ hora; se agitó la nueva mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se colocó luego la mezcla reactiva sobre un baño de vapor de agua y se refluó durante una hora; se dejó enfriar a la temperatura ambiente y luego se colocó en un baño de hielo durante unos 20 minutos, tras lo cual precipitó el ácido N-alil-ftalámico, que se separó por filtración, se secó durante la noche en un desecador y resultó pesar 92,4 g. y tener un punto de fusión de 115°-117° C. El producto volvió a ser cristalizado a partir de acetona; pesó 60,2 g. y presentó un punto de fusión de 115°-117° C. El análisis calculado ofreció unos porcentajes de C (64,38%) y H (5,40%), similares al análisis obtenido: C (64,40%), H (5,50%). Por un método similar, con acetona como disolvente, se prepararon ácido N-bencil-ftalámico, ácido N-n-propil-ftalámico y otros ácidos requeridos, variándose las condiciones de reacción según las proporciones de las diversas aminas empleadas.

⁶¹³ AHOEPM, patente 278.857; la memoria descriptiva consta de trece páginas, escritas a máquina, fechadas en Madrid, a 2 de julio de 1962; su contenido es acorde con las patentes británicas 24056/ 61 y 35473/61, otorgadas el 4 de julio y 2 de octubre de 1961, respectivamente. El solicitante tiene fijado su domicilio en Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente española fue concedida el 22-IX-1962 y publicada el 1-XI-1962.

⁶¹⁴ Entre las sales de estos compuestos figuran las sódicas, potásicas, cálcicas y aluminicas, amónicas sustituidas, sales atóxicas de aminas como las trialkil-aminas, incluyendo trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenil-amina, 1-efén-amina, N,N'-dibencil-etilén-diamina, dehidro-abietil-amina, N,N-bis-dehidro-abietil-etilén-diamina y otras aminas que se han empleado para formar sales con bencil-penicilina.

Para preparar este tipo de compuestos, el ácido 6-amino-penicilánico, preferiblemente en forma de sal neutra, tal como la sal sódica o la sal trietil-aminica, reacciona con un cloruro ácido de fórmula general



R₁, R₂, R₃ y R₄ tienen el mismo significado que el indicado líneas arriba, o su equivalente funcional como agente acilante para un grupo amino primario⁶¹⁵.

La preparación de este tipo de compuestos comprende la mezcla de un ácido (cuyo cloruro se ha definido líneas arriba) con el cloro-carbonato alquílico y una amina alifática o hidro-carbonila terciaria, tal como la trietil-amina, en un disolvente anhidro, inerte y preferiblemente miscible en agua, como el dioxano y, si se desea, una pequeña cantidad de acetona seca y pura, durante unos 30 minutos en frío, por ejemplo a 4 ° C. A esta solución del anhídrido mezclado se le añade una solución enfriada de ácido 6-amino-penicilánico y amina hidro-carbonila terciaria, por ejemplo trietil-amina, en un disolvente apropiado, por ejemplo agua. La mezcla de reacción se agita durante un período de una hora, aproximadamente, para formar la sal amónica sustituida del producto deseado. La mezcla puede extractarse a un pH alcalino con un disolvente inmiscible en agua, como es el éter, para separar los productos iniciales que no han reaccionado. El producto en la fase acuosa se convierte luego en ácido libre, preferiblemente en frío bajo una capa de éter, mediante la adición de ácido mineral diluido, por ejemplo H₂SO₄ 5 N a un pH 2; luego se extrae el ácido libre en un disolvente orgánico neutro e inmiscible en agua, tal como el éter, lavándose el extracto rápidamente con agua fría y secando a continuación. El producto del extracto etéreo en su forma de ácido libre se convierte luego en cualquier sal metálica o amina mediante tratamiento con la base adecuada, por ejemplo una amina libre como una base de procaina o una solución de 2- etil-hexanoato potásico en n-butanol seco. Estas sales son generalmente insolubles en disolventes tales como el éter y pueden recuperarse en forma pura mediante simple filtración.

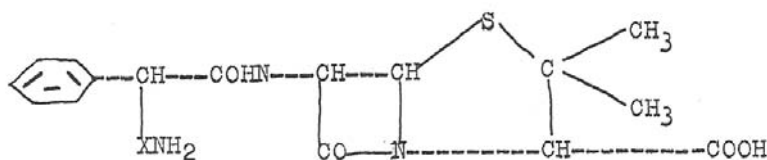
Otro método de preparación de una solución etérea de la forma ácida de un compuesto del tipo de los consignados en esta patente, comprende la preparación de una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico y bicarbonato sódico, la adición del cloruro ácido⁶¹⁶ y la vigorosa agitación a la temperatura ambiente, por ejemplo durante 20 a 60 minutos. A continuación se extrae la mezcla con éter para separar los reactivos iniciales hidrolizados o que no hayan reaccionado: luego se acidifica la solución a un pH 2 y se extrae en éter la forma de ácido libre del producto, este extracto etéreo es secado, por ejemplo con sulfato sódico anhidro, y se separa del agente secante para dar una solución etérea seca de la que se aísla el producto, preferentemente en forma de una sal insoluble en éter, tal como la sal potásica. Este método se usa cuando el cloruro ácido reacciona con una amina primaria con mayor rapidez que con el agua, hecho que se determina mediante un simple ensayo.

⁶¹⁵ Tales equivalentes incluyen los correspondientes bromuros ácidos carboxílicos, anhídridos ácidos y anhídridos mezclados con otros ácidos carboxílicos, contemplando mono-ésteres y particularmente ésteres alifáticos inferiores de ácido carbónico.

⁶¹⁶ El cloruro ácido puede sustituirse por una cantidad equimolar del correspondiente bromuro ácido o anhídrido ácido.

Como en los demás procesos, la temperatura elegida para la preparación de los derivados del ácido penicilánico no debe exceder, en general, de 30° C, en muchos casos la temperatura ambiente es la adecuada; han de evitarse unas condiciones fuertemente ácidas o alcalinas, es preferible realizarlo a un pH entre 6-9, lo cual puede conseguirse utilizando un neutralizador, por ejemplo una solución de bicarbonato sódico o de fosfato sódico. Es conveniente añadir una solución acuosa de una sal del ácido 6-amino-penicilánico a una solución del agente acilante en un disolvente inerte y, preferiblemente, uno que sea miscible en agua, como cetona o dimetil-formamida. Cuando ha terminado la reacción, se aíslan los productos, si se desea, mediante las técnicas, bien conocidas, utilizadas con bencil-penicilina y fenoxi-metil-penicilina⁶¹⁷.

El 13 de septiembre de 1963 la empresa italiana, *Lepetit S.p.A.* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un "Procedimiento de preparación de penicilina"⁶¹⁸, de fórmula general



X representa un alquileo y sus sales, comprendiendo las sales metálicas no tóxicas, por ejemplo sales de sodio, potasio, aluminio, amonio y amonio sustituido, obtenidas por reacción con aminas comúnmente usadas en el campo de las penicilinas, tales como procaína, dibencil-amina o N,N'-dibencil-etileno-diamina.

Estos compuestos se preparan al hacer reaccionar ácido 6-amino-penicilánico con ácido alfa-fenil-carbo-benzoxi-amínico, en presencia de trietil-amina y disociando el grupo protector por hidrogenación catalítica. Los compuestos poseen un átomo de

⁶¹⁷ Los autores proponen nueve casos con los que ilustrar este procedimiento; nos limitamos al primero de ellos: se añadió, a gotas, una solución de cloruro de DL-alfa-acetoxi-fenil-acetilo (212 mg.) en acetona seca (3,4 ml.), durante 10 minutos, a una solución agitada de ácido 6-amino-penicilánico (216 mg.) en una solución acuosa de bicarbonato sódico al 3% (8,4 ml.) y acetona (5,0 ml.); completada la adición, se agitó la mezcla a la temperatura ambiente durante 1 hora y luego se extrajo con éter (45 ml. en tres porciones), quedando retenida sólo la fase acuosa; esta solución acuosa se cubrió con butanol (2 ml.) y se ajustó a un pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico 1 N. Después de separar las capas, se extrajo la fase acuosa con dos porciones de 1,5 ml. de butanol, ajustando el pH a 2 cada vez. Las soluciones butanólicas combinadas (que en ese momento contenían el ácido penicilánico libre) fueron lavadas con agua y luego agitadas con el mismo líquido (7 ml.) al que se añadió suficiente bicarbonato sódico al 3% para que la fase acuosa tuviera un pH 7. A continuación se extrajo la solución butanólica con dos porciones de 4 ml. de agua, a cada una de las cuales se añadió suficiente solución de bicarbonato para producir una fase acuosa de pH 7. Las soluciones acuosas combinadas fueron lavadas con éter y luego evaporadas a baja temperatura y presión para originar la sal sódica cruda de alfa-acetoxi-bencil-penicilina que, después de secarse en un secador al vacío, se obtuvo en forma de sólido amarillo pálido (237 mg.). Por ensayo manométrico se determinó que su pureza era del 77%; inhibió a *Staphylococcus aureus* a 0,12 mcg./ml. y se mostró estable frente a los ácidos, como se probó por el hecho de que un 92% de la penicilina permaneció inalterado después de que se hubo mantenido durante 1 hora, a 35° C, en una solución a un pH 2. Se demostró cromatográficamente que, en presencia de hígado homogeneizado, este compuesto se hidroliza enzimáticamente en la correspondiente alfa-hidroxi-bencil-penicilina.

⁶¹⁸ AHOEPM, patente 280.754; la memoria descriptiva consta de ocho páginas escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, el 13 de septiembre de 1962. El expediente se corresponde con la solicitud de patente presentada, en Gran Bretaña, con fecha 14-II-1962 y registro 5688/62. La empresa figura como domiciliada en *via Abruzzi*, 94, Milan (Italia). La patente española le fue concedida el 24-XI-1962 y hecha pública el 1-II-1963.

carbono asimétrico y pueden prepararse, por procedimientos corrientes, los diastereoisómeros correspondientes⁶¹⁹.

Los autores han probado la concentración mínima, *in vitro*, de algunas de estas nuevas penicilinas contra distintos microorganismos patógenos⁶²⁰, señalan su resistencia a los ácidos⁶²¹ y a ‘penase’ (una beta-lactamasa), y ofrecen algunos ejemplos prácticos⁶²².

El 18 de febrero de 1963 la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento para la preparación de penicilinas”⁶²³, desarrollado por un par de investigadores suecos: Berndt Olof Harald Sjöberg y Bertil Ekström.

⁶¹⁹ Así, por ejemplo, las formas ópticamente activas de beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina, se preparan partiendo de ácidos alfa-fenil-beta-carbo-benzoxi-amino-propiónicos racémicos obtenidos de la mezcla racémica, por medio de su sal, con bases ópticamente activas, tales como quinina, cinconina, estricnina o morfina.

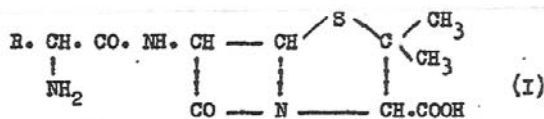
⁶²⁰ Concretamente, la actividad de DL-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina, D(-)-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina y DL-gamma-amino-alfa-fenil-propil-penicilina, frente a distintas cepas de *Staphylococcus pyogenes-aureus*, *Staphylococcus faecalis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella schott-muellari*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*.

⁶²¹ Los autores analizan el comportamiento de algunas de estas nuevas penicilinas en ácido clorhídrico (pH=1), en comparación con fenoxi-etil-penicilina, una de las penicilinas menos sensibles a los ácidos; los porcentajes de penicilina no degradada se tabulan en diferentes momentos de tiempo transcurrido: 0, 30 y 60 minutos.

⁶²² Nos ocupamos del primero de ellos: a una cantidad de 82,5 g. de ácido beta-amino-alfa-fenil-propiónico en 200 cm³ de hidróxido sódico al 10%, se añade, gota a gota, a 15° C y con agitación, a 98 g. de cloro-carbonato de bencilo. La agitación se continúa a la temperatura ambiente durante 90 minutos; la solución se extrae con éter dietílico y la capa acuosa se acidula hasta el ‘rojo congo’ con ácido sulfúrico al 50%. El precipitado oleaginoso se extrae con éter dietílico, los extractos se lavan con agua, se secan y, evaporados, proporcionan 140 g. de ácido N-carbo-benzoxi-beta-amino-alfa-fenil-propiónico, con punto de fusión entre 124°-127° C. A 125 g. de quinina, en 700 cm³ de alcohol etílico al 90%, se añade una solución caliente de 140 g. de ácido N-carbo-benzoxi-beta-amino-alfa-fenil-propiónico en 500 cm³ de alcohol etílico. La mezcla se enfría y el precipitado se filtra, alcanzando un rendimiento de 13 g., con un punto de fusión entre 176°-177° C, (alfa) 25/D = 125° (0,2% en alcohol etílico). La sal de quinina se suspende en un litro de agua, la mezcla se acidula con ácido clorhídrico al 10% y se extrae con éter dietílico. Los extractos combinados se lavan con agua, se secan sobre ácido sulfúrico y se evaporan para obtener 55 g. de ácido(-)-N-carbo-benzoxi-beta-amino-alfa-fenil-propiónico, con punto de fusión entre 99°-100° C, (alfa) 25/D = -93° (1% alcohol etílico). A una mezcla de 52 g. de ácido (-)-N-carbo-benzoxi-beta-amino-alfa-fenil-propiónico se añaden, gota a gota y con agitación, 1.300 cm³ de acetona anhidra y 27 cm³ de trietil-amina anhidra, enfriadas a 0° C, y 18,5 cm³ de cloro-carbonato de etilo. La mezcla se mantiene, bien agitada, durante 10 minutos después de terminar la adición, luego se enfría a -50° C y se trata con porciones de 37,5 g. de ácido 6-amino-penicilánico en 100 cm³ de bicarbonato sódico al 4%, manteniendo la temperatura inferior a 0° C. La agitación se continúa durante 30 minutos a la temperatura ambiente; la mezcla se extrae con éter dietílico, luego se ajusta a un pH de 2 con HCl y se extrae con éter dietílico; los extractos etéreos se lavan con agua y se ajustan a un pH de 6,2, con bicarbonato sódico al 4%. La solución de la sal sódica de la (-)-N-carbo-benzoxi-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina se añade a una sustancia de CaCO₃ acuoso, previamente saturada con hidrógeno y la mezcla se agita durante una hora; posteriormente se filtra, se ajusta a un pH de 4,6 y se concentra a un volumen reducido *in vacuo* con congelación. La producción es de 40 gramos de (-)-beta-amino-alfa-fenil-etil-penicilina, con un punto de fusión entre 225°-230° C (con descomposición), (alfa) 20/D = -230° C.

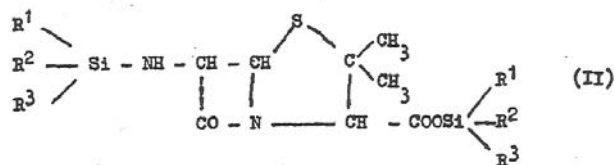
⁶²³ AHOEPM, patente 285.236; la memoria descriptiva consta de 21 páginas escritas a máquina, firmadas en Madrid, el 18 de febrero de 1963. El expediente se corresponde con las patentes británicas

Esta invención se relaciona con el proceso de preparación de penicilinas alfa-amino-sustituídas a partir de derivados sililos del ácido 6-amino-penicilánico; proporciona un proceso de preparación de penicilinas de fórmula general



R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o aralquilo, que puede ser sustituido.

y sus sales atóxicas⁶²⁴, cuyo proceso comprende la reacción de un compuesto de la fórmula general



R¹, R² y R³ son iguales o diferentes y cada uno de ellos es un grupo arilo o aralquilo.

o una solución del mismo, o mezclas de reacción crudas que se obtienen cuando se deja reaccionar el ácido 6-amino-penicilánico con agentes sililantes o soluciones de tales mezclas, con un derivado reactivo de un ácido carboxílico de fórmula general R-CH(NH₂)-COOH, separando posteriormente los grupos sililos mediante solvólisis⁶²⁵.

En una forma de esta invención, se trata una base Schiff de un aminoácido con un hidroxialdehído aromático, tal como 2-hidroxil-1-naftaldehído ó 5-cloro-cloro-salicilil-aldehído con un éster del ácido clorofórmico en un disolvente anhidro, tal como dimetil-formamida, acetona, cloroformo o tetra-hidro-furano, a una temperatura inferior a 0° C y, seguidamente, el anhídrido mezclado obtenido se deja reaccionar *in situ* con un derivado reactivo sililo del ácido 6-amino-penicilánico. A continuación se añade agua y se acidifica la mezcla a un pH 2 durante un corto período de tiempo para hidrolizar los grupos sililos y el grupo arilideno. La separación de los grupos sililos se realiza con facilidad mediante la adición de agua o de un alcohol a la mezcla en reacción; de esta manera los grupos sililos se transforman inmediatamente en disiloxanos o acoxi-silanos, que son solubles en disolventes orgánicos y se separan convenientemente de la mezcla de reacción. La fácil separación de los grupos protectores empleados contrasta con las dificultades experimentadas con otros grupos protectores, por ejemplo el grupo carbencil-oxi, utilizados en la síntesis clásica de amino-penicilinas a partir del ácido 6-amino-penicilánico.

Los productos preparados de acuerdo con este procedimiento pueden aislarse y purificarse mediante las mismas técnicas empleadas con otras amino-penicilinas. Si el ácido carboxílico contiene uno o más centros simétricos, las correspondientes

7751/62 y 7752/62 del 28-II-1962. La empresa figura como domiciliada en Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente española le fue concedida el 1-III-1963 y hecha publica el 1-IV-1963.

⁶²⁴ El grupo amino, (R¹).(R²).(R³)-Si-X no puede tomar parte en la reacción, en el sentido de que ha recibido la adición de un protón y está incluido en un anhídrido cíclico, tal como una oxazolid-2,5-diona o está condensado con un hidroxialdehído aromático en una base de Schiff.

⁶²⁵ Entre estas sales atóxicas se incluyen sales sódicas, potásicas, cálcicas y aluminicas, amónicas y amónicas sustituidas, por ejemplo sales de aminas atóxicas tales como trietil-aminas, incluyendo la trietil-amina, procaína, dibencil-amina, 1-efemina, N,N¹-dibencil-etileno-diamina, dehidro-abietil-amina, N,N¹-bis-dehidro-abietileno-diamina y otras aminas que se han empleado para formar sales con bencil-penicilina.

penicilinas pueden existir en formas de diastereoisómeros, todas ellas son, según los autores de esta memoria, biológicamente activas.

Los ésteres trialquil-sililos del ácido 6-N-trialquil-silil-amino-penicilánico se preparan tratando una sal de ácido 6-amino-penicilánico, por ejemplo la sal sódica, potásica o cálcica, con un cloro-trialquil-silano, en un disolvente orgánico como benceno, tolueno, formamida o dimetil-formamida, en presencia de una base terciaria orgánica, como trietil-amina, etil-piperidina ó 2,6-lutidina. Después de agitar durante algunas horas, se obtiene una solución del compuesto sililo que, si se desea, puede usarse para la síntesis de penicilina. Si el disolvente se separa en vacío, el compuesto sililo queda como residuo oleoso que puede cristalizarse.

Otro método de preparación de los compuestos sililos incluye el calentamiento de ácido 6-amino-penicilánico con un exceso de un exalquil-disil-azano a una elevada temperatura, mientras que se separa continuamente la base liberada.

Un método más de preparación de estos derivados trialquil-sililos del ácido 6-amino-penicilánico consiste en calentar una mezcla de ácido 6-amino-penicilánico con más de 2 moles de una N-trialquil-silil-dimetil-amina, a una temperatura de 50° a 170° C, de manera que se destile la dialquil-amina que se forma en la reacción. Ésta se completa ordinariamente al cabo de una hora y se separa en vacío el exceso de trialquil-silil-dialquil-amina que pueden usarse como reactivos. Enfriando las soluciones en éter dietílico, éter de petróleo o N-trimetil-silil-dietil-amina por ejemplo, el derivado sililo puede cristalizar. Los grupos sililos sustituidos de los compuestos son separados por adición de agua o un alcohol, como metanol o etanol y, debido a su sensibilidad respecto a los hidroxilantes, se preparan mejor bajo condiciones estrictamente anhidras.

El 8 de marzo de 1963 es la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* quien presenta a registro un nuevo “Procedimiento de producción de penicilinas”⁶²⁶, debido a la invención de los norteamericanos David A. Jonhson y Elwin J. Richardson, en la que la acilación de ácido 6-amino-penicilánico con el correspondiente haluro de ácido carboxílico se produce en un medio de reacción acuosa, a un pH ácido⁶²⁷, en presencia de un disolvente orgánico inmiscible con agua; frente a este método, ya conocido⁶²⁸, los autores proporcionan un proceso perfeccionado,

⁶²⁶ AHOEPM, patente 285.863; la memoria descriptiva consta de dieciséis hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 8 de marzo de 1963. La empresa figura como establecida en Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). Esta solicitud se corresponde a las patentes estadounidenses números 179.456/62, 179.486/62 y 179.487/62, todas del 13 de marzo de 1962. La patente española fue concedida el 23-IV-1963 y publicada el 16-VI-1963.

⁶²⁷ En la memoria se indica que las penicilinas producidas por este procedimiento se correlacionan con las solicitudes de patentes españolas números 258.215, 258.322 y 265.959.

⁶²⁸ Cuando la producción se efectúa en medios acuosos, tal como en este caso, se mantiene el pH entre 6 y 9 por medio de un neutralizador, tal como el bicarbonato sódico, durante la reacción del cloruro ácido con el ácido 6-amino-penicilánico, para formar la penicilina. Estudios anteriores sobre la formación de aminas habían revelado que se deben usar condiciones neutras o alcalinas; así lo indica Wilfred John HICKINBOTTOM (*Reaction of organic compounds*, Nueva York: Longmans, Green & Co., 1938, págs. 262-263). Se emplea un exceso de la amina cuando la reacción con el cloruro ácido tiene lugar en un disolvente orgánico anhidro; si la reacción se realiza en agua y en presencia de álcali acuoso diluido, como en la técnica de Schotten-Baumann, Hickinbottom afirma que es esencial que la solución acuosa permanezca alcalina durante toda la acilación.

particularmente respecto al incremento de la producción y a la simplificación de las operaciones.

Este nuevo procedimiento comprende la mezcla del ácido 6-amino-penicilánico con, por lo menos, un equivalente del adecuado cloruro, bromuro o yoduro ácido, a un pH altamente ácido, en un medio de reacción acuoso constituido por una emulsión inestable de agua y un disolvente inerte e inmiscible en agua, a una temperatura de 0° a 50° C -preferiblemente de 20° a 35° C-, la separación de la fase rica en disolvente orgánico conteniendo dicha penicilina y la recuperación de esta fase en un proceso de producción de una penicilina que comprende la mezcla de ácido 6-amino-penicilánico con 1,0 a 4,5 equivalentes del adecuado cloruro, bromuro o yoduro ácido, a un pH del orden de 2 a 4 -preferiblemente 2-, en un medio de reacción acuosa, constituido por una emulsión inestable de agua, consistente en ésteres alifáticos y cetona, preferiblemente cetona metil-isobutílica y acetatos alquílicos inferiores. El volumen del disolvente orgánico es de $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ del volumen de agua fría, a fin de reducir su costo y proporcionar una solución más concentrada de la penicilina, pero este volumen inferior no es esencial y de hecho, en ciertos casos, es ventajoso usar un volumen de disolvente orgánico superior al de la fase acuosa que contiene el ácido 6-amino-penicilánico⁶²⁹. En cualquier caso, la mezcla de reacción ha de ser muy vigorosa y continuamente agitada, y estará formada por agua y un disolvente orgánico inmiscible con ella, es decir ha de ser una emulsión inestable.

Las penicilinas producidas por este procedimiento son las formadas por la reacción de ácido 6-amino-penicilánico con un cloruro ácido o un equivalente del mismo, que reaccione con el ácido 6-amino-penicilánico más rápidamente que con el agua, según determinación por simple ensayo⁶³⁰.

El ácido 6-amino-penicilánico usado en este procedimiento se prepara como sólido, concentrado acuoso o constituido de un caldo de fermentación según el procedimiento descrito por Frank Ralph Batchelor, Frank Peter Doyle, John-Herbert-Charles y George Newbolt Rolinson en 1959⁶³¹; o bien se prepara como sólido o solución acuosa por hidrólisis enzimática de penicilinas tales como bencil-penicilinas y fenoxi-metil-penicilina, como señalaron George Newbolt Rolinson *et als.*⁶³², C.A. Claridge *et als.*⁶³³, H.T. Huang *et als.*⁶³⁴ y W. Kaufmann *et als.*⁶³⁵ en sus estudios publicados en 1960.

⁶²⁹ Así, por ejemplo, cuando la concentración acuosa de ácido 6-amino-penicilánico sea superior a 5 mg/ml.

⁶³⁰ Ejemplos de tales penicilinas son las alfa-fenoxi-alkil-penicilinas, por ejemplo alfa-fenoxi-etil-penicilina, alfa-fenoxi-propil-penicilina y alfa-fenoxi-butil-penicilina; alfa-fenoxi-bencil-penicilina, 2-bifenilil-penicilina e isoxazolil-penicilina, por ejemplo 5-metil-3-fenil-4-isoxazolil-penicilina y 3-o-cloro-fenil-5-metil-4-isoxazolil-penicilina, y sus sales atóxicas.

⁶³¹ Frank Ralph BATCHELOR, Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON. "Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations". *Nature*, 183: 257-258. Londres, 1959.

⁶³² George Newbolt ROLINSON, Frank Ralph BATCHELOR, D. BUTTERWORTH, J. CAMERON-WOOD, M. COLE, G. C. EUSTACE, Marian V. HART, M. RICHARDS, E.B. CHAIN. "Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis". *Nature*, 187: 236-237. Londres, 1960. Los autores aluden, también, a las patentes estadounidenses 3.014.845 y 3.014.846.

⁶³³ C.A. CLARIDGE, A. GOUREVITCH y J. LEIN. "Bacterial Penicillin Amidase". *Nature*, 187: 237-238. Londres, 1960.

Constituye una particular ventaja de este proceso el poder usar ácido 6-amino-penicilánico obtenido en caldos de fermentación o hidrolizados enzimáticos, sin purificación o concentración; antes de usar tales soluciones de ácido 6-amino-penicilánico es ventajoso, pero no esencial, separar material sólido -como micelios o células- por filtración o centrifugación y retirar toda penicilina presente así como cualquier ácido (tal como ácido fenil-acético o ácido fenoxi-acético), mediante simple extracción a un pH ácido, en un disolvente orgánico inmiscible.

En la realización de este procedimiento, el pH de la reacción de activación se mantiene en el nivel ácido deseado mediante la adición de álcali, cuando sea necesario; generalmente, tal adición es precisa cuando se usan soluciones acuosas puras de ácido 6-amino-penicilánico o hidrolizados enzimáticos, pero no cuando se emplea un caldo de fermentación de penicilina exento de precursor.

Una variación de este proceso se lleva a cabo mezclando, simultáneamente, cloruro ácido, cetona metil-isobutílica y caldo de fermentación de penicilina exento de precursor filtrado, a un pH 2, para dar una reacción muy rápida, por ejemplo del orden de cinco minutos, y descargando luego la emulsión activa del producto en centrifugadora para la separación de la fase disolvente que contiene penicilina⁶³⁶.

El 27 de abril de 1963 la empresa norteamericana *Bristol-Myers Company* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un "Procedimiento de preparación de penicilinas"⁶³⁷, debido a la inventiva del canadiense Yvon Gaston Perrson y de los estadounidenses Lee C. Cheney y John C. Godfrey; el proceso está relacionado con la fabricación de ácidos 6-[alfa-hidroxi-alfa-(hetero-ciclil) acetamido]-penicilánicos y sus sales atóxicas⁶³⁸, particularmente activos

⁶³⁴ H.T. HUANG, A.R. ENGLISH, T. A. SETO, G. M. SHULL, B.A. SOBIN. "Enzymatic hydrolysis of the side chain of penicillins". *Journal of the American Chemical Society*, 82(14): 3790-3791. Washington DC, 1960.

⁶³⁵ W. KAUFMANN, K. BAUER. "Enzymatische Spaltung und Resynthese von Penicillin". *Naturwissenschaften*, 47: 474-475. Berlín, 1960.

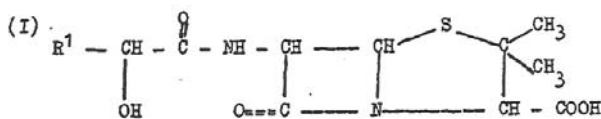
⁶³⁶ Los autores proponen una decena de ejemplos para ilustrar el proceso; nos ocupamos del primero de ellos: a un caldo de fermentación de penicilina exento de precursor y filtrado, conteniendo ácido 6-amino-penicilánico (6-APA), se añadió la mitad de volumen de cetona metil-isobutílica y se agitó vigorosamente la mezcla, acidificándose a un pH 2; a continuación se añadió, a temperatura ambiente (20°-25° C), una cantidad de cloruro de ácido alfa-fenoxi-propionico (PPC) suficiente para dar una reacción molar entre cloruro ácido y 6-APA; el pH se mantuvo en el valor de 2 sin ajuste adicional; la mezcla se agitó durante 30 minutos. La fase de cetona metil-isobutílica, que contenía el producto alfa-fenoxi-metil-penicilina, fue separada y el producto fue precipitado directamente, como su sal potásica, mediante la adición de 1/20 de volumen de acetato potásico acuoso concentrado (pH 8,2-8,7). La omisión de la cetona metil-isobutílica del anterior procedimiento resultó reducir las producciones ca. 75%; el uso de acetato butílico en lugar de cetona metil-isobutílica dio resultados igualmente buenos. En 25 experimentos comparables, en los que se mantuvo el pH de la reacción en 7,5 y en los que las concentraciones molares varían de 2,0 a 5,5, la producción media de producto sólido aislado fue del 61%.

⁶³⁷ AHOEPM, patente 287.497; la memoria descriptiva queda fechada en Madrid, a 27 de abril de 1963. La empresa figura como establecida en Thompson Road, East Syracuse (Nueva York. EE. UU.). Esta solicitud se corresponde a las patentes estadounidenses números 190.774/62, 190.776/62 y 190.795/62, presentadas todas ellas el 27 de abril de 1962. La patente española fue concedida el 19-X-1963 y publicada el 1-XII-1963.

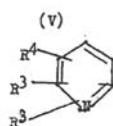
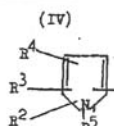
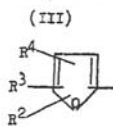
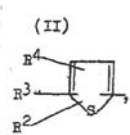
⁶³⁸ Los autores señalan que también están incluidas, en el ámbito de esta patente, las sales ácidas carboxílicas atóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo sales metálicas como las de sodio, potasio, calcio y aluminio; la sal amónica y la sales amónicas sustituidas, por ejemplo trialkil-aminas,

contra bacterias gram-positivas, tanto en administración parenteral u oral, mostrando también resistencia a la destrucción por ácidos y penicilinas.

Este procedimiento permite construir estructuras del tipo (I), en la que R¹ se corresponde con alguna de las fórmulas (II), (III), (IV) o (V)

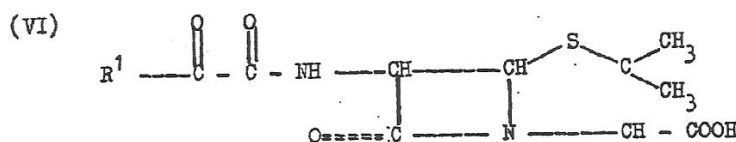


R⁵ es hidrógeno, alquilo (inferior), alcanoilo (inferior), alquil (inferior) sulfonilo, fenilo, cloro-fenilo, fenetilo o un radical ciclo-alquilo que tenga de 5 a 7 átomos de carbono inclusive⁶³⁹.



R², R³ y R⁴ son hidrógeno, cloro, bromo, flúor, iodo, nitro, alquilo (inferior), alcoxilo (inferior), alquiltio (inferior), diaquil (inferior) amino, alcanoil (inferior), alquil (inferior), sulfonilo, radicales ciclo-alquilo que tengan de 5 a 7 átomos de carbono inclusive, o radicales arilos, aralquilos, ariloxilos o aralquioxilos sustituidos o sin sustituir.

También son obtenibles, por este procedimiento, un grupo de alfa-ceto-penicilinas de fórmula (VI)



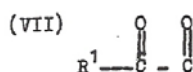
R¹ se corresponde con alguna de las fórmulas (II), (III), (IV), (V) [vide supra]

Estas alfa-ceto-penicilinas, que son también útiles agentes antimicrobianos, se preparan mediante la reacción del ácido 6-amino-penicilánico -preferiblemente en forma de una sal neutra tal como la sódica, potásica o trietil-amínica-, con cloruro ácido⁶⁴⁰ o el equivalente funcional de dicho cloruro ácido⁶⁴¹, que puede actuar como

incluyendo trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, procaína, N,N'-dibencil-etileno-diamina, dehidro-abietil-amina, N,N'-bis-dehidro-abietil-etileno-diamina, N-alquil(inferior)-piperidina y otras aminas que hayan sido empleadas para formar sales con bencil-penicilina. Así mismo, están también contemplados los ésteres y amidas fácilmente hidrolizables que se convierten a la forma de ácido libre por hidrólisis química o enzimática.

⁶³⁹ Los autores señalan que el término 'alquil (inferior)', tal como aquí se emplea, se utiliza para indicar radicales hidrocarburos alifáticos de cadena recta y ramificada que tengan de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, amilo, hexilo etc. En general, cuando el término 'inferior' se usa como parte de la descripción de otro grupo, por ejemplo 'alcoxilo (inferior)', se refiere a la porción alquímica de tal grupo. El término 'alcoxilo inferior' incluye radicales como metoxilo, etoxilo, isopropoxilo, etc.; el término 'alquiltio (inferior)' incluye acetilo, propionilo, butirilo, etc.; el término 'alquil (inferior) sulfonilo' incluye metil-sulfonilo, etil-sulfonilo, hexil-sulfonilo, etc.; el término 'dialquil (inferior) amino' incluye dimetil-amino, dietil-amino, etil-metil-amino, etc.

⁶⁴⁰ Del tipo señalado en la fórmula (VII), donde R¹ se corresponde con alguna de las fórmulas (II), (III), (IV), (V) [vide supra].



Los ácidos alfa-(heterociclil)-alfa-ceto-acéticos sustituidos y los correspondientes cloruros acetílicos, que se emplean en la preparación de los compuestos de este procedimiento pueden prepararse mediante una diversidad de métodos sintéticos; detalladas explicaciones de métodos de preparación de estos reactivos iniciales se encuentran en E.H. RODD (ed.). *Chemistry of Carbon-Compounds*.

agente acilador para el grupo amino primario del ácido 6-amino-penicilánico. Estas alfa-ceto-penicilinas pueden prepararse, también, mediante el uso de una azida ácida o un reactivo carbo-diimida⁶⁴².

El proceso de producción de hidroxipenicilina comprende el contacto, en un medio sustancialmente acuoso, a un pH superior a 7 y a una temperatura del orden de -5° a 40° C, de una alfa-ceto-penicilina, o un a sal de la misma, con 1 a 12 equivalentes de boro-hidruro sódico, trimetoxi-boro-hidruro sódico o boro-hidruro potásico, para producir la correspondiente hidroxipenicilina, o su sal⁶⁴³.

Otro procedimiento consiste en la reacción de ácido 6-amino-penicilánico, preferiblemente en forma de sal neutra, con un ácido alfa-hidroxi-alfa-(heterocicilil)-acético, en presencia de un reactivo carbo-diimida⁶⁴⁴. Una cantidad equimolar de la sal neutra del ácido 6-amino-penicilánico, en una solución acuosa de reactivo, se añade lentamente a una solución en cantidad equimolar de ácido alfa-hidroxi-alfa-(heterocicilil)-acético y se remueve la mezcla durante una a dos horas; la diciclo-hexil-urea que se forma como precipitado se separa por filtración; se liofiliza el filtrado y el sólido así obtenido se disuelve en una pequeña cantidad de agua; se ajusta el pH en 6-7 y se filtra la solución para separar cualquier material insoluble. Se enfría el filtrado a unos 5° C, se separa en capas con un cuarto de volumen de metil-isobutil-cetona y se acidifica a un pH 2, mientras se remueve la mezcla. La capa de metil-isobutil-cetona es separada y desechada; la capa acuosa, que contiene el producto deseado, es enfriada a 0° C y extractada con una solución de dioctil-succinato sódico o 2-etil-hexanoato potásico. El extracto es filtrado y neutralizado a un pH de 5-6; se forma un precipitado del ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(heterocicilil)-acetamido]-penicilánico.

Otra versión de esta patente consiste en la reacción del ácido 6-amino-penicilánico -preferiblemente en forma de una sal neutra- con un cloruro de alfa-(heterocicilil)-alfa-(acilado-hidroxi)-acetilo, el cual porta un grupo bloqueador destinado a proteger el grupo hidroxilo, o el equivalente funcional de dicho cloruro ácido, que puede actuar como agente acilador para el grupo amino primario del ácido 6-amino-penicilánico, y la ulterior separación del grupo bloqueador del grupo hidroxilo por hidrogenación, bajo condiciones suficientemente suaves para evitar la destrucción del núcleo de penicilina, en presencia de un catalizador como paladio, platino o rodio sobre

Ámsterdam/Oxford: Elsevier Publishing Company, 1956. Estos ácidos pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos descritos por F.F. BLICKE, M.U. TSAO. "Antispasmodics. VII". *Journal of the American Chemical Society*, 66(10): 1645-1648. Washington DC, 1944, por medio de una reacción del Friedel-Crafts con el apropiado tiofeno o furano y un cloruro de ácido oxálico.

⁶⁴¹ Tales equivalentes incluyen los correspondientes bromuros ácidos carboxílicos, anhídridos ácidos y anhídridos mezclados con otros ácidos carboxílicos, mono-ésteres y, particularmente, ésteres alifáticos inferiores de ácido carbónico.

⁶⁴² Al modo en que queda descrito en John C. SHEEHAN, George P. HESS. "A new method of forming peptide bonds". *Journal of the American Chemical Society*, 77(4): 1067-1068. Washington DC, 1955. Los autores remiten, también, a los métodos generales de preparación y purificación de las alfa-ceto-penicilinas que se describen en las patentes estadounidenses 2.941.995, 2.996.501, 2.985.648 y 2.951.839.

⁶⁴³ Cuando se usa como intermedio de producción de alfa-hidroxi-penicilinas la sal alfa-ceto-penicilina, puede emplearse en forma ácida o como sal y no es necesario que las sales sean atóxicas, pero el catión debe ser tal que no obstaculice la reducción química.

⁶⁴⁴ Tal como N,N'-dicloro-hexil-carbodiimida o N,N'-diisopropil-carbodiimida en dioxano u otro disolvente tal como tetra-hidro-furano, cloruro de metileno, etc.

un soporte inerte del tipo del carbonato bórico, carbonato estróncico o tierra de diatomeas⁶⁴⁵. Los autores completan la memoria con una docena de ejemplos⁶⁴⁶,

⁶⁴⁵ La hidrogenación se lleva cabo, preferiblemente, a la temperatura ambiente y a presión atmosférica, utilizando agua como disolvente, un producto orgánico no reducible como el etanol o dioxano, o soluciones acuosas de estos disolventes orgánicos, siendo el pH de la mezcla reactiva de 5-9.

⁶⁴⁶ En ellos se detallan procesos para preparar la sal potásica del ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-tienil)-acetamido]-penicilánico, la sal potásica del ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-furil)-acetamido]-penicilánico, 6-[alfa-(3-tienil)-glioxil-amido]-penicilinato potásico, 6-[alfa-hidroxi-alfa-(3-tienil)-acetamido]-penicilinato potásico, un diastereoisómero de 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-tienil)-acetamido]-penicilinato potásico, un diastereoisómero de 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-furil)-acetamido]-penicilinato potásico, la sal potásica del ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-piridil)-acetamido]-penicilánico, la sal sódica del ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(3-piridil)-acetamido]-penicilánico, la sal potásica del ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-pirrolil)-acetamido]-penicilánico y un diastereoisómero de 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-pirrolil)-acetamido]-penicilinato potásico.

Nos ocupamos del método señalado para preparar la sal potásica del ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-tienil)-acetamido]-penicilánico. Parte A: preparación de ácido alfa-tienil-glicoxílico: se enfría a -5° C una mezcla de tiofeno (1,0 moles, 84,0 g.), cloruro de oxalil etilo (1,0 moles, 137,0 g.) y 1.500 ml. de tetra-cloro-metano y se añade tricloruro aluminico en porciones durante un período de 45 minutos; se deja que la mezcla adquiera la temperatura ambiente, se remueve durante tres horas y se vierte luego, en una mezcla de hielo, HCl. La capa orgánica se separa cuidadosamente y se agita, sucesivamente, con HCl 6 N, cinco porciones de agua y, una vez, con una solución diluida de carbonato sódico; luego se seca la capa orgánica sobre Na₂SO₄, se filtra y se libera de disolventes por destilación. El producto, alfa-tienil-glioxilato-etílico, tiene un punto de ebullición de 90°-91° C, a una presión de 0,15 mm. de mercurio. Se refluje durante 12 horas una mezcla de reacción conteniendo alfa-tienil-glioxilato-etílico (64,4 g., 0,349 moles), carbonato sódico mono-hidratado (1.16,0 g., 0,95 moles) en 500 ml. de agua; después de refluir, se hierve la mezcla reactiva con carbón vegetal y se filtra, evaporándose hasta su secado. El residuo sólido blanco es disuelto con ácido clorhídrico 6 N frío, y extractado con tres porciones de 300 ml. de éter. Los extractos combinados son secados y despojados del éter para originar un sólido que es recrystalizado dos veces a partir de benceno hirviente; se forma un producto cristalino, ácido alfa-tienil-glioxílico, de peso 19,0 g. y que funde a 88°-90° C.

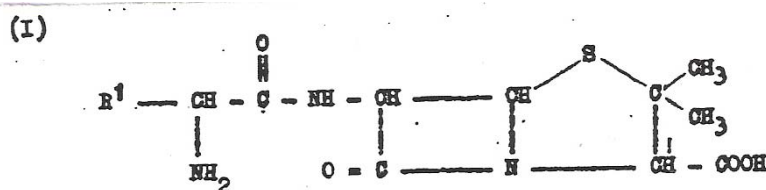
Parte B: preparación de cloruro del ácido alfa-tienil-glicoxílico: se refluje suavemente, durante 7 horas, una mezcla de reacción conteniendo cloruro de tionilo (24 g., 0,2 moles), ácido alfa-tienil-glioxílico (15,86 g., 0,1 moles) en 100 ml. de dicloro-metano y 0,5 cm³ de piridina; luego se filtra. Los disolventes y el exceso de cloruro de tionilo son separados del filtrado por evaporación a presión reducida. El producto resultante, cloruro del ácido alfa-tienil-glicoxílico, es recuperado como aceite.

Parte C: preparación de 6-[alfa-(2-tienil)-glioxil-amido]-penicilinato potásico: se añade, a gotas, una solución del cloruro del ácido 2-tienil-glioxílico (preparado como se ha indicado) en 100 ml. de acetona, a una solución enfriada y vigorosamente removida (-5° C) de ácido 6-amino-penicilánico (21,6 g., 0,1 moles) y bicarbonato sódico (42,0 g., 0,5 moles) en 200 ml. de agua y 100 ml. de acetona. Al completarse la adición de la solución, se remueve la mezcla de reacción a la temperatura ambiente durante dos horas; luego se diluye dicha mezcla con 200 ml. de agua y es extractada dos veces con metil-isobutil-cetona. La capa acuosa extractada es enfriada y acidificada a un pH 2 con H₃PO₄ 6 N, luego extractada, una vez más, con metil-isobutil-cetona. El extracto que contiene al producto deseado, ácido 6-[alfa-(2-tienil)-glioxil-amido]-penicilánico, es lavado con agua y secado sobre sulfato sódico anhidro. El tratamiento del extracto con 50 ml. de una solución butanólica del 40% de 2-etil-hexanoato potásico, precipita algo de sal potásica del anterior ácido inicial sin reaccionar. Luego se seca la solución de metil-isobutil-cetona por destilación azeotrópica, a presión reducida y se diluye con éter seco (1 litro), que precipita la sal potásica de la penicilina. Esta sal potásica es secada al vacío sobre P₂O₅ y recuperada como polvo soluble en agua, pesa 3,1 g. y contiene la estructura beta-lactamica mostrada por análisis infrarrojo e inhibe a *Staphylococcus aureus* a una concentración del 0,001% en peso.

Parte D: preparación de 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-tienil)-acetamido]-penicilinato potásico: a una solución helada de 6-[alfa-(2-tienil)-glioxil-amido]-penicilinato potásico (2,1 g., 0,005 moles) en 15 ml. de agua destilada y trihidro-acetato sódico (1,0 g.), se añade NaBH₄ (0,21 g., 0,005 moles), en porciones tales que la temperatura no pase de 10° C y no se pierda ninguna mezcla en reacción por espumado. Durante la adición, se mantiene el pH en 8 mediante la adición intermitente, en gotas, de ácido acético o glacial. Se añade éter intermitentemente, de acuerdo con las necesidades, para evitar el espumado por descenso de la tensión superficial. Una vez completada la adición de NaBH₄ se remueve la mezcla en el baño de hielo durante 10 minutos, luego durante ½ hora sin el baño de hielo y, seguidamente, se pasa a un

El 27 de abril de 1963 la americana *Bristol-Myers Company* presentó, en el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, una invención relativa a un "Procedimiento de preparación de penicilinas"⁶⁴⁷, desarrollado por el canadiense Yvon Gaston Perris y los norteamericanos Lee C. Cheney y John C. Gofrey, relacionado con los ácidos 6-[alfa-amino-alfa-(heterociclil)-acetamido]-penicilánicos y sus sales atóxicas⁶⁴⁸, que poseen una potente actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, administrables por vía parenteral u oral y que muestran resistencia a la destrucción por ácido y a la penicilinas. El tipo de compuestos es muy similar a la patente presentada, por esta misma empresa, y en este mismo día, ante la Administración española (AHOEPM, patente 287.497).

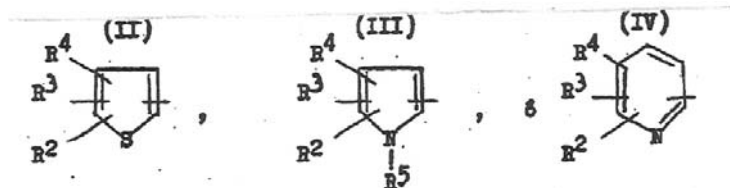
Estos ácidos tienen por fórmula general la indicada bajo estas líneas, y R¹ corresponde a las fórmulas (II), (III) y (IV)



embudo separador y se extracta con éter; después se separa, en capas, la fase acuosa, con 75 ml. de éter y se ajusta en un pH 2 mediante al adición de H₃PO₄ mientras se mantiene fría la mezcla en un baño de hielo. El extracto etéreo que contiene el producto, ácido 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-tienil)-acetamido]-penicilánico, es lavado con dos porciones de 400 ml. de agua, secado brevemente sobre Na₂S₂O₄ anhidro y filtrado. Se forma la sal potásica y precipita como aceite, mediante la adición de 40 ml. de 2- etilhexanoato potásico al 40% en n-butanol; la adición de otros 50 ml. de n-butanol causa el precipitado del producto como la sal potásica, que cristaliza. Se lava el precipitado con 10 cm³ de n-butanol y 10 cm³ de acetona y se seca a presión reducida. El 6-[alfa-hidroxi-alfa-(2-tienil)-acetamido]-penicilinato potásico pesa 1,0 g., contiene la estructura beta-lactamica y difiere de la ceto-penicilina inicial, según muestra el análisis infrarrojo, funde a 228° C, inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0,05 mcg./ml. y exhibe, contra dicho estafilococo, tras su inyección intramuscular en ratones, una C_{D50} de 0,6 mcg./kg.

⁶⁴⁷ AHOEPM, patente 287.498; la memoria descriptiva consta de treinta y una hojas, mecanografiadas por una sola cara; queda fechada en Madrid, a 27 de abril de 1963. La empresa figura como establecida en Thompson Road, East Syracuse (Nueva York. EE. UU.). Esta solicitud se corresponde a las patentes estadounidenses números 190.781/62 y 190.776/62, presentadas ambas el 27 de abril de 1962. La patente española fue concedida el 19-X-1963 y publicada el 1-XII-1963.

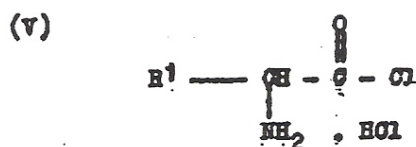
⁶⁴⁸ Los autores incluyen, como parte de su patente, las sales de ácidos carboxílicos farmacéuticamente aceptables, tales como sales sódicas, potásicas, cálcicas y alumínicas, la sal amónica y las sales amónicas sustituidas, por ejemplo sales de aminas atóxicas tales como trialkil-aminas, incluyendo trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N'-dibencil-etileno-diamina, dehidro-abietil-amina, N,N-bis-dehidro-abietil-etileno-diamina, N-(inferior)-alquil-piperidina y otras aminas que hayan sido utilizadas para formar sales con bencil-penicilina. También forman parte del ámbito de esta patente las sales de aminas, incluyendo las sales de adición de ácidos minerales como el hidro-cloruro, hidro-bromuro, hidro-yoduro, sulfato, sulfamato y fosfato y las sales de adición de ácidos orgánicos tales como el maleato, acetato, citrato, oxalato, succinato, benzoato, tartrato, fumarato, malato, mandelato, ascorbato y similares. También están incluidos los ésteres o amidas fácilmente hidrolizables que se convierten a la forma ácida libre mediante hidrólisis química o enzimática.



R⁵ es hidrógeno, alquilo (inferior), alcanóilo (inferior), alquil-sulfonilo (inferior), fenilo, clorofenilo, fenetilo o un radical ciclo-alquilo que tenga de 5 a 7 átomos de carbono inclusive⁶⁴⁹.

R², R³ y R⁴ son hidrogeno, cloro, bromo, flúor, nitro, alquilo (inferior), alcoxilo (inferior), alquiltio (inferior), di-(inferior)-alquil-amino, alcanóil-amino (inferior), alcanóilo (inferior), di-(inferior)-alquil-amino, alcanóil-amino (inferior), alcanóilo (inferior), alquil-sulfonilo (inferior), radicales cicloalquilos que contengan de 5 a 7 átomos de carbono inclusive o radicales arilos, aralquilos, arloxilos o aral-quioxilos sustituidos o sin sustituir.

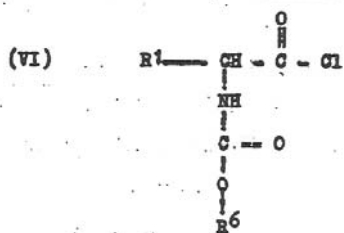
El método seguido consiste en la reacción del ácido 6-amino-penicilánico -o sal neutra del mismo-, con un cloruro hidrocioruro de alfa-(heterociclil)-glicina, del tipo de formula general (V), donde R¹ tiene el significado señalado líneas arriba



El cloruro hidrocioruro de alfa-(heterociclil)-glicilo se forma mediante reacción de la correspondiente alfa-(heterociclil)-glicina, suspendida en un disolvente adecuado y enfriada a 0° C, con una cantidad equimolar de pentacloruro de fósforo. El cloruro hidrocioruro de alfa-(heterociclil)-glicido se obtiene como precipitado y es recuperado por filtración. Este producto se añade lentamente a una solución de una cantidad equimolar de ácido 6-amino-penicilánico -o su sal- en agua o en un medio líquido acuoso a un pH bajo y se mantiene a una temperatura de 0° C. Se agita la solución durante algunos minutos y, una vez completada la adición del cloruro hidrocioruro, se ajusta el pH de 4 a 6, y se retira la acetona por destilación al vacío. La solución acuosa resultante del ácido 6-[alfa-amino-alfa-(herociclil)-acetamido]-penicilánico es filtrada para separar cualquier material insoluble. Se enfría el filtrado a 5° C, se separa en capas con un cuarto de volumen de metil-isobutil-cetona, se acidifica a un pH 2 y, al mismo tiempo, se agita la mezcla. La capa de metil-isobutil-cetona es separada y desechada. Luego se enfría la capa acuosa a 0° C y se extracta con una solución de sulfo-succinato-dioctilo sódico en metil-isobutil-cetona. El extracto es filtrado y neutralizado a un pH de 5 a 6 y se forma un precipitado del ácido penicilínico 6-sustituido.

Otra posibilidad señalada por los autores consiste en la reacción de ácido 6-amino-penicilánico -preferiblemente en forma de una sal neutra- con un cloruro de alfa-(heterociclil)-alfa-(sustituido-amino)-acetilo de fórmula general (VI) y la subsiguiente separación del grupo bloqueador del radical amino por hidrogenación, bajo condiciones suficientemente suaves para evitar la destrucción del núcleo de penicilina.

⁶⁴⁹ Los autores emplean el término 'inferior' en el mismo sentido que tenía en la patente anterior (AHOEPM, patente 287.497) [vide supra].



R¹ tiene el significado señalado líneas arriba.

R⁶-O-C-O- es un grupo bloqueador destinado a proteger al radical amino, o el equivalente funcional de dicho ácido⁶⁵⁰, que puede actuar como agente acilador del grupo amino primario de ácido amino-penilínico⁶⁵¹.

Otro procedimiento es la reacción de un ácido alfa-(heterociclil)-alfa-aminoacético⁶⁵² con ácido 6-amino-penicilánico, en presencia de un reactivo carbo-diimida; este proceso comprende la adición de una solución de una carbo-diimida, como N,N'-diciclo-hexi-diimida o N,N'-diisopropil-diimida, en dioxano u otros disolventes, tales como tetra-hidro-furano o cloruro de metileno, a una solución de una cantidad equimolar de una sal neutra de ácido 6-amino-penicilánico en una solución acuosa de dioxanos, tetra-hidro-furano o cloruro de metileno. Se añade lentamente una solución de una cantidad equimolar del ácido alfa-(heterociclil)-alfa-amino-acético y se remueve la mezcla enfriando al mismo tiempo, durante una a dos horas. La dicloro-hexil-urea que se forma como precipitado es separada por filtración; el filtrado es liofilizado y el sólido así obtenido se disuelve en una pequeña cantidad de agua; se ajusta el pH entre 6-7 y se filtra la solución para separar cualquier material insoluble. Resulta así una solución acuosa del ácido 6-[alfa-amino-alfa-(heterociclil)-acetamido]-penicilánico, de la cual se aísla el producto de la forma ya indicada.

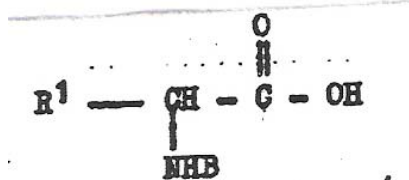
Otra variación de esta patente es la reacción de ácido 6-amino-penicilánico con un cloruro de alfa-(heterociclil)-alfa-azido-acetilo⁶⁵³, de fórmula general

⁶⁵⁰ Tales equivalentes funcionales incluyen a los correspondientes bromuros ácidos, anhídridos ácidos y anhídridos mezclados con otros ácidos carboxílicos, tales como monoésteres y, en especial, éteres alifáticos inferiores, de ácido carbónico.

⁶⁵¹ En el grupo bloqueador, R⁶ puede ser alilo, butilo terciario, fenilo o fenilo sustituido, bencilo o bencilo sustituido, o bien R⁶-COO- puede ser el grupo tritilo (Ph)₃C- [Ph representa un grupo fenilo]. El grupo bloqueador R⁶-COO- puede separarse por hidrogenación del derivado aminoacilo protegiendo el ácido 6-amino-penicilánico en presencia de un catalizador como paladio, platino o rodio, sobre un soporte inerte tal como carbono, carbonato bórico, carbonato de estroncio o tierra de diatomeas. La hidrogenación se lleva a cabo, preferiblemente, a temperatura ambiente y a presión atmosférica, en un disolvente tal como el agua, un disolvente orgánico no reducible, como etanol o dioxano, o soluciones acuosas de estos disolventes orgánicos, siendo el pH de la mezcla de 5 a 9.

⁶⁵² Los ácidos alfa-(heterociclil)-alfa-amino-acéticos sustituidos, y los correspondientes cloruros acetilos empleados en la preparación de estos compuestos, pueden prepararse por una variedad de métodos sintéticos; los autores remiten a E.H. RODD (ed.). *Chemistry of Carbón-Compounds*. Ámsterdam/Oxford: Elsevier Publishing Company, 1956. Los haluros alfa-(heterociclil)-alfa-(amino-sustituido)-acetilos se logran haciendo reaccionar la correspondiente alfa-heterociclil-glicina, o una sal de la misma, con un adecuado éster de ácido cloro-carbónico; si la reacción de cantidades equivalentes de una alfa-tienil-glicina con cloro-carbonato de bencilo produce un ácido alfa-(carbo-bencilo-amino)-tienil-acético, éste puede convertirse en un cloruro ácido; como variante, este ácido puede mutarse en los agentes aciladores funcionalmente equivalentes.

⁶⁵³ El ácido alfa-(heterociclil)-alfa-azido-acético puede prepararse de acuerdo con el método descrito por W. Frederick HUBER. "Mono-α-aminoacyl and Mono-α-dipeptide triglycerides". *Journal of the American Chemical Society*, 77(1): 112-116. Washington DC, 1955.



R¹ tiene el significado indicado líneas arriba, o el equivalente funcional de dicho ácido, que puede actuar como agente acilador del grupo amino primario del ácido 6-aminopenicilánico.

y subsiguientemente hidrogenación del grupo ácido bajo condiciones suficientemente suaves para evitar la destrucción del núcleo de penicilina⁶⁵⁴.

Este mismo día, el 27 de abril de 1963, la empresa norteamericana que nos ocupa, *Bristol-Myers Company*, presentó un tercer expediente ante el servicio español de patentes, destinado a proteger un "Proceso de preparación de penicilinas"⁶⁵⁵, avalado

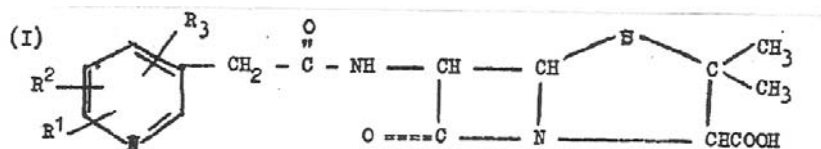
⁶⁵⁴ Los autores proponen una colección de catorce ejemplos, a través de los cuales explican la preparación de ácido D,L-6-[alfa-amino-(2-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido D,L-6-[alfa-amino-(3-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido D,L-6-[alfa-amino-(3-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido 6-[alfa-amino-(5-etil-2-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido 6-[alfa-amino-(5-metil-2-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido 6-[alfa-amino-(5-t-butil-2-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido 6-[alfa-amino-(2-5-dimetil-3-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido 6-[(-)-alfa-amino-(3-tienil)-acetamido]-penicilánico, ácido D,L-6-[alfa-amido-(3-tienil)-acetamido]-penicilánico, hidrocloreto del ácido D,L-6-[alfa-amino-(4-piridil-acetamido)]-penicilánico, hidrocloreto del ácido D,L-6-[alfa-amino-(3-piridil)-acetamido]-penicilánico, ácido D,L-6-[alfa-amino-(3-piridil)-acetamido]-penicilánico, ácido D,L-6-[alfa-amino-(2-pirrolil)-acetamido]-penicilánico y ácido 6-[(-)-alfa-amino-(2-tienil)-acetamido]-penicilánico.

Utilizamos la preparación de ácido D,L-6-[alfa-amino-(2-tienil)-acetamido]-penicilánico, a manera de ejemplo: se suspende alfa-(2-tienil)-glicina (5,0 g., 0,032 moles) en 35 ml. de cloruro de metileno y se enfría a -7° C, con removido y en presencia de cloruro cálcico; se añade penta-cloruro de fósforo (10 g., 0,048 moles) en una porción que produce la elevación de la temperatura a -3° C; se remueve la mezcla durante media hora mientras se mantiene la temperatura de -5° a 0° C; se añaden 15 ml. de cloruro de metileno y se continúa removiendo a una temperatura de -5 a 0° C durante otra media hora; luego se añaden 10 gotas de formamida dimetilica y se agregan otras 20 ml. de cloruro de metileno para fluidificar la mezcla; se remueve ésta rápidamente y resulta una suspensión purpúrea. El producto, hidrocloreto cloro de D-L-alfa-(2-tienil)-glicilo, es recogido por filtración bajo presión reducida, lavado tres veces con cloruro de metileno y secado al vacío sobre P₂O₅; el peso del producto es de 5,9 g., con un rendimiento del 72%. Se ajusta el pH de una solución de ácido 6-amino-penicilánico (4,1 g., 0,019 moles) en 80 ml. de agua a 6,3 mediante la adición de una solución, al 10% en peso, de NaOH, agitando al mismo tiempo; luego se diluye la solución con 340 ml. de acetona y se enfría a -5° C; posteriormente se ajusta el pH en 2,5 mediante la adición de HCl 6 N a la mezcla removida. A la solución resultante se añade cloruro dicloruro de D-L-alfa-(2-tienil)-glicilo (5,9 g., 0,028 moles) en un período de 20 minutos, manteniéndose el pH entre 2 y 2,5 por adiciones intermitentes de una solución de NaOH al 10%. Se remueve la solución durante 5 minutos después de completarse la adición del cloruro hidrocloreto y se ajusta a un pH 4,8 con la adición de un 10% de NaOH. Se separa la acetona a baja presión, a una temperatura de 30°-34° C y se filtra la solución para separar el material insoluble; el filtrado, que tiene un pH de 4, es enfriado a 5° C y ajustado a un pH de 7 con una solución de H₂SO₄ al 20%. Al retirarse la capa de metil-isobutil-cetona, se aclara el color de la restante capa acuosa; esta capa acuosa es extractada de nuevo con 20 ml. de metil-isobutil; el extracto de metil-isobutil-cetona es separado por decantación, filtrado a través de Na₂SO₄ anhidro y ligeramente concentrado por evaporación a baja presión y 30° C; luego se neutraliza a un pH de 5,3 mediante la adición de trietil-amina. El producto sólido que se forma es recogido por filtración a presión reducida, mezclado con éter, filtrado de nuevo y secado al vacío sobre P₂O₅. El producto, ácido D,L-6-[alfa-amino-(2-tienil)-acetamido]-penicilánico, pesó 2,6 g., contenía la estructura beta-lactamica mostrada por análisis infrarrojo, fundía con descomposición a 186°-190° C e inhibía a *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0,2 mg./ ml.

⁶⁵⁵ AHOEPM, patente 287.499; la memoria descriptiva consta de quince páginas mecanografiadas por una sola cara; queda fechada en Madrid, a 27 de abril de 1963. La empresa figura como establecida en Thompson Road, East Syracuse (Nueva York. EE. UU.). Esta solicitud se corresponde a la patente estadounidense número 190.777/62, presentada el 27 de abril de 1962. La patente española fue concedida el 21-X-1963 y publicada el 1-XII-1963.

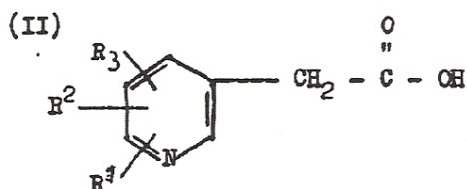
por la firma de los investigadores norteamericanos John C. Godfrey y Lee C. Cheney y relacionado, como las dos anteriores (AHOEPM, patentes 287.497, 287.498) con la formación de ácidos 6-[alfa-(3-piridil)-acetamido]-penicilánicos y sales atóxicas de ellos⁶⁵⁶.

Los productos a los que se refiere esta patente se corresponden con la fórmula general (I)



R¹, R² y R³ representan un hidrógeno, nitro, alquilo (inferior), alcoxilo (inferior), alquiltio (inferior), alquil-amino (inferior), dialquil-(inferior)-amino, alcanoil-(inferior)-amino, alcanoil (inferior), alquil-(inferior)-sulfonilo, radicales ciclo-alquilo o ciclo-alcoxidos que tengan de 5 a 7 átomos de carbono inclusive y radicales aralquilo, ariloxilos y aralquiloilos sustituidos o sin sustituir⁶⁵⁷.

El procedimiento conlleva la reacción del ácido 6-amino-penicilánico, preferiblemente en forma de sal neutra, tal como su sal sódica, potásica o trimetilamínica, con una cantidad equimolar de un ácido alfa-(piridil)-acético de fórmula (II);



R¹, R² y R³ tienen el significado indicado arriba o corresponden con el equivalente funcional de dicho ácido, que puede actuar como agente acilador del grupo amino primario del ácido 6-amino-penicilánico⁶⁵⁸.

como disolventes para esta reacción pueden usarse dioxanos, cloruro de metileno, tetra-hidro-furano, o mezclas de ellos.

Otro procedimiento consiste en la reacción de un ácido alfa-(3-piridil)-acético y ácido 6-amino-penicilánico, en presencia de una carbo-diimida, que comprende la adición de una solución de una carbo-diimida, tal como N,N'-díciclo-hexil-carbo-diimida ó N,N'-diisopropil-carbo-diimida, en dioxano u otro disolvente, del tipo de tetra-hidro-furano, cloruro de metileno, etc. En este procedimiento, se añade una disolución en dioxanos de una cantidad equimolar de un ácido de fórmula (II) y se remueve la mezcla, con enfriamiento, durante 1 a 2 horas; la díciclo-hexil-urea que se

⁶⁵⁶ Como en los casos anteriores, se incluyen, como parte de la patente, las sales ácidas carboxílicas atóxicas farmacéuticamente aceptables, como son las sales metálicas sódicas, potásicas, cálcicas y aluminicas, las sales amónicas y las sales amónicas sustituidas, por ejemplo sales de aminas tales como como trialquil-aminas, incluyendo la trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N'-dibencil-etileno-diamina, dehidro-abietil-etil-amina, N,N'-bis-dehidro-abietil-etileno-diamina, N-alquil(inferior)-piperidina y otras aminas que han sido utilizadas para formar sales con bencil-penicilina. También están incluidas las sales de adición ácida atoxicas de las aminas, incluyendo las sales de adición ácidas minerales, tales como el hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, sulfamato y fosfato y las sales de adición ácidas orgánicas, tales como los maleatos, acetatos, citratos, mandelatos, ascorbato y similares. Asimismo se incluyen los ésteres o amidas fácilmente hidrolizables que son convertidos en la forma ácida libre por hidrólisis química o enzimática.

⁶⁵⁷ Los términos 'alquilo (inferior)', 'alcoxilo (inferior)', 'alcóxido (inferior)', 'alquiltio (inferior)', 'alcanoil (inferior)', 'alquil (inferior)', 'dialquil (inferior)' y, en general el restrictivo '(inferior)' se entiende de igual modo que en las patentes anteriores de este mismo grupo (*vide supra*).

⁶⁵⁸ Tales equivalentes incluyen los correspondientes haluros ácidos, azidas ácidas, anhídridos ácidos y anhídridos mezclados con otros ácidos carboxílicos, incluyendo mono-ésteres y particularmente ésteres alifáticos inferiores del ácido carbónico.

forma como precipitado es retirada por filtración y lavada con agua fría; el agua de lavado es añadida al filtrado y éste es liofilizado. Se trata el residuo de la liofilización con una pequeña cantidad de agua fría, se ajusta el pH en 6,5 con bicarbonato sódico, se retira todo material insoluble por filtración. El filtrado es enfriado, separado en capas con una pequeña cantidad de éter y acidificado a pH 2 con ácido sulfúrico 6 N. Las capas son separadas, y la capa acuosa es extractada con otra pequeña porción de éter; luego se ajusta la capa acuosa a un pH 4 con bicarbonato sódico y se extrae con varias porciones de acetato etílico. Los extractos combinados del acetato etílico son secados sobre sulfato sódico anhidro y se forma la sal potásica de la penicilina mediante la adición de 2-etil-hexanoato potásico⁶⁵⁹.

En el proceso ejemplificado, los compuestos están a veces, en la solución acuosa, en la forma de su sal sódica o potásica; estos compuestos en fase acuosa pueden convertirse luego en el ácido libre, preferiblemente en frío, bajo una capa de éter, mediante la adición de ácido mineral diluido, por ejemplo H_2SO_4 5 N, a un pH 4. El ácido libre se extrae luego en un disolvente orgánico neutro, inmiscible en agua, a continuación debe lavarse el extracto rápidamente en frío, secarse con Na_2SO_4 anhidro y recuperarse el ácido libre de la solución etérea. El producto del extracto etéreo, en su forma ácida libre, puede convertirse en cualquier sal metálica o amina deseada, por tratamiento con la base apropiada, por ejemplo una amina libre, tal como procaína básica, o una solución de 2-etil-hexanoato potásico en n-butanol seco. Estas sales son ordinariamente insolubles en disolventes como el éter y pueden recuperarse en forma pura por simple filtración.

Los autores proponen media decena de ejemplos para ilustrar el procedimiento de preparación de la sal potásica del ácido 6-[alfa-(3-piridil)-acetamido]-penicilánico⁶⁶⁰.

⁶⁵⁹ Los ácidos alfa-(3-piridil)-acéticos y los correspondientes anhídridos ácidos y cloruros acetilos que pueden emplearse en la preparación de los compuestos de este procedimiento, se preparan mediante una serie de métodos sintéticos comunes en las técnicas operativas. Muchos de estos compuestos iniciales ya están descritos anteriormente y otros de ellos son comercialmente obtenibles. Los autores remiten a E.H. RODD (ed.). *Chemistry of Carbon-Compounds*. Ámsterdam/Oxford: Elsevier Publishing Company, 1956.

⁶⁶⁰ Nos ocupamos de este primero: se preparó y enfrió a -5°C una solución de ácido (3-piridil)-acético (13,65 g., 0,0988 moles) en 150 ml. de dimetil-formamida y 350 ml. de dicloro-metano; a esta solución se añadió clorformato etílico (10,71 g., 0,0988 moles) produciendo la subida de la temperatura a -1°C ; luego se enfrió y se removió la mezcla en reacción, durante media hora, a -5°C . Se añadió una solución a -2°C de ácido 6-amino-penicilánico (22,4 g., 0,104 moles) en 250 ml. de dicloro-metano y trietil-amina seca (29,3 cm^3 , 0,208 moles), de una vez, a la primera mezcla de reacción, causando la elevación de la mezcla resultante de reacción a 0°C y el desprendimiento de dióxido de carbono durante varios minutos. Se removió la mezcla durante 40 minutos a -5°C ; se retiró el dicloro-metano por destilación al vacío a 35°C , se diluyó la mezcla resultante, activa, con 2 l. de éter seco y se filtró a continuación. Se añadió al filtrado 2-etil-hexanoato potásico (20 g.) en una pequeña cantidad de acetato etílico, causando la formación de un precipitado blanco cristalino. Se recogió el precipitado por filtración y se secó, dio un peso de 13,0 g., se disolvió en 50 ml. de agua acidificada a un pH de 1,8 con ácido sulfúrico 6 N. Se extrajo la solución acuosa con dos porciones de 100 ml. de éter; luego se ajustó la solución acuosa a un pH de 4,0 con bicarbonato sódico, se filtró y se extrajo con cuatro porciones de 100 ml. de acetato etílico frío. Se secó el extracto sobre sulfato sódico anhidro y se añadió 2-etil-hexanoato potásico para precipitar el producto. Luego se secó por centelleo la solución conteniendo el producto precipitado y volvió a suspenderse en acetato etílico. El producto, la sal potásica del ácido 6-[alfa-(3-piridil)-acetamido]-penicilánico, fue recogido por filtración y secado sobre P_2O_5 ; dio un peso de 0,45 g., fundió a $224^\circ\text{--}227^\circ\text{C}$ con descomposición, contenía el anillo beta-lactámico mostrado por análisis infrarrojo, e inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0.1 mcg./ml., exhibiendo contra dicho estafilococo, tras su inyección en ratones, un CD_{50} de 1,8 mg./kg.

El 1 de agosto de 1963 es la empresa *Beecham Research Laboratories Limited* quien presenta, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger “Un procedimiento para preparar alfa-amino-bencil-penicilina”⁶⁶¹, debido al ingenio del británico Maurice John Soualal.

El procedimiento de obtención consiste en hacer reaccionar alfa-bromo-bencil-penicilina⁶⁶², o una sal no tóxica de ella⁶⁶³, con hexa-metileno-tetramina. Se efectúa la reacción en un disolvente adecuado, a temperatura ambiente y, preferentemente, a presión atmosférica; esta penicilina contiene, al menos, un átomo de carbono asimétrico, por lo tanto puede existir en las formas D- y L- y en la mezcla de ambas. Los productos que se preparan de acuerdo con este procedimiento son fáciles de aislar y purificar por medio de las técnicas habituales utilizadas con otras penicilinas⁶⁶⁴.

2.2.7.e. *Alcohol penicilinas*

El 27 de septiembre de 1960 la empresa norteamericana *Chas. Pfizer & Co. Inc.* presentó al registro de patentes español un expediente para proteger, por veinte años, una invención relativa a “Un método para producir alcohol penicilinas alfa-sustituidas”⁶⁶⁵. Los compuestos de penicilina a los que se refiere este procedimiento tienen por fórmula general

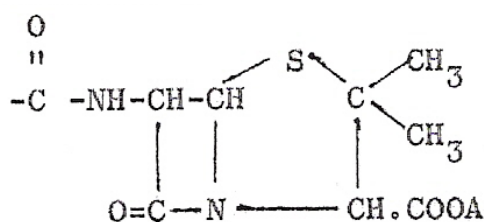
⁶⁶¹ AHOEPM, patente 290.518; la memoria descriptiva consta de cuatro páginas, escritas a máquina, firmadas en Madrid, a 1 de agosto de 1963. El expediente está basado en el presentado ante la Administración británica el 18-VIII-1962, bajo el registro 31.791/62. La patente española fue concedida el 7-IX-1963 y publicada el 16-X-1963.

⁶⁶² El método de obtención de alfa-bromo-bencil-penicilina, utilizada aquí como materia prima, fue registrado por esta misma empresa (AHOEPM, 258.755).

⁶⁶³ Son sales no tóxicas de la alfa-amino-bencil-penicilina ciertas sales metálicas como las de sodio, potasio, calcio y aluminio, la sal amónica y las sales amónicas sustituidas; sales de tales aminas no tóxicas son, entre otras, las de trietil-aminas, en las que se pueden incluir la trietil-amina, procaina, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N'-dibencil-etileno-diamina, dehidro-alfa-bietil-amina y N,N-bis-dehidro-alfa-dietil-etileno-diamina.

⁶⁶⁴ El autor presenta un par de ejemplos prácticos, nos ocupamos del primero de ellos: a un volumen de 100 cm³ de una solución de cloroformo que contiene 13,5 gr (0,33 moles) de alfa-bromo-bencil-penicilina (preparada acidificando y extrayendo una solución acuosa de la sal sódica de la penicilina), se añade un volumen de 100 cm³ de una solución formada por hexa-metileno-tetramina (16 g.; 0,114 moles) disuelta en 1.000 cm³ de cloroformo, agitando en el momento de la mezcla y operando a temperatura ambiente, inmediatamente la mezcla se oscurece. Al cabo de 1 hora se le añade un gran volumen de éter, precipitándose el producto de la reacción; después de filtrarse, lavarse con éter y secarse, se obtienen 16,2 g. de un polvo amarillo pálido que, mediante cromatografía en papel y ensayo microbiológico, se determinó contenía un 25% de alfa-amino-bencil-penicilina junto con una cantidad igual de bromo-penicilina. Al adicionar más éter a la solución madre se obtuvo una segunda cantidad del polvo, 2,8 g., conteniendo 14% de amino-bencil-penicilina. Por lo tanto, el rendimiento total de la alfa-amino-penicilina fue del 39%.

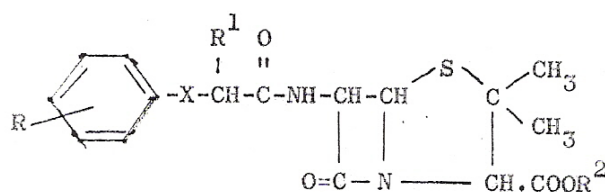
⁶⁶⁵ AHOEPM, patente 261.318; la memoria descriptiva consta de dieciséis hojas, escritas a máquina por una sola cara, fue firmada en Madrid a 27 de septiembre de 1960. El expediente se corresponde con la solicitud presentada en EE. UU. el 28 de septiembre de 1959, bajo el número 842.573/59. La empresa está domiciliada en 11 Barlett Street, Brooklyn (Nueva York. EE. UU.). La patente española fue concedida el 19-XII-1960 y publicada el 1-II-1961.



A representa un hidrógeno o un radical formador de sal, no tóxico, que difiere solamente en la naturaleza de grupo unido en $O=C$.

Las propiedades que presenta una penicilina particular de este conjunto están determinadas por este grupo unido.

Esta nueva serie de alcohol penicilinas alfa-sustituidas, y sus sales, aunque útiles por vía parenteral, son especialmente activas por vía oral⁶⁶⁶. Los nuevos compuestos suponen una diferencia estructural con relación a las fenoxi-alcohil-penicilinas, pues tienen un grupo sustituyente sobre el átomo de carbono adyacente a la unidad penicilina. Responden a la fórmula general:



R. hidrógeno, alcohilo, amino, nitro, ciano, hidroxilo o halógeno.

R¹. alcohilo.

R². hidrógeno o un radical que forma una sal no tóxica.

X. oxígeno o azufre.

Los autores señalan que la introducción de un grupo alcohilo en la molécula de fenoxi-metil-penicilina origina productos que, mientras poseen un espectro antibacteriano análogo al de la fenoxi-metil-penicilina contra microorganismos gram-negativos y gram-positivos, están caracterizados por niveles notablemente más altos en el suero sanguíneo, velocidades más rápidas de absorción y una resistencia mayor a la degradación en el organismo animal, incluyendo el organismo humano.

La alfa-fenoxi-etil-penicilina, y sus sales, cuando se administran oralmente en ratones infectados con *Staphylococcus aureus* 5, presentan una PD₅₀ de 1,5 mcg./kg. de peso corporal⁶⁶⁷. Cuando se administra, en las mismas condiciones y contra el mismo microorganismo, por vía parenteral presenta una PD₅₀ de 0,78 mcg./kg. La fenoxi-metil-penicilina, cuando se ensaya en las mismas condiciones y contra el mismo microorganismo, presenta una PD₅₀ de 2 mcg./kg. para administración oral y una PD₅₀ de 1,5 mcg./kg. para administración parenteral.

Cuando se administra a perros, por vía oral, la alfa-fenoxi-etil-penicilina logra un incremento importante en los niveles del suero sanguíneo a dosis de 10 mg./kg. de peso corporal, frente a la fenoxi-metil-penicilina⁶⁶⁸. En los seres humanos se obtienen incrementos significativos, en niveles de antibiótico en suero sanguíneo, utilizando alfa-fenoxi-etil-penicilina frente a fenoxi-metil-penicilina⁶⁶⁹. El análisis cromatográfico,

⁶⁶⁶ La patente incluye las sales no tóxicas de las formas ácidas de estas nuevas penicilinas; es decir, sales metálicas como las sales de potasio y sodio, sales de amonio y de amonio sustituidas, por ejemplo las sales de aminas no tóxicas como procaína, dibencil-amina, N,N-dibencil-etilén-diamina, 1-efén-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina y otras aminas empleadas para formar sales con bencil-penicilina.

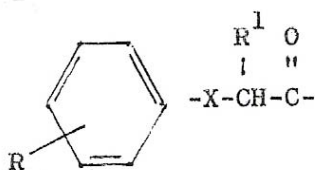
⁶⁶⁷ La PD₅₀ es la dosis, expresada en mcg./kg. de peso corporal, que conservará vivos al 50% de los animales de ensayo.

⁶⁶⁸ En la memoria se presenta una tabla con valores comparativos de niveles, en suero sanguíneo, para alfa-fenoxi-etil-penicilina y su homólogo, fenoxi-metil-penicilina, administrada en perros, por vía oral, a razón de 10 mg./kg. de peso corporal.

⁶⁶⁹ Los autores proporcionan una tabla comparativa de niveles de penicilina en suero sanguíneo humano tras la administración oral de alfa-fenoxi-etil-penicilina y fenoxi-metil-penicilina en dosis de 250 mg. de antibiótico, calculado sobre la base de ácido libre.

sobre papel, de muestras de orina humana, después de la ingesta oral de alfa-fenoxi-etil-penicilina, ha revelado una incidencia muy pequeña de ácido 6-amino-penicilánico; pero si la ingesta hubiera sido de fenoxi-metil-penicilina, la presencia del citado ácido se detecta rápidamente en la orina de la mayoría de los sujetos examinados. El alfa-sustituyente sobre la cadena lateral de penicilina parece que compensa, o neutraliza, los procesos degradantes que dan como resultado la escisión del grupo amida.

Las nuevas alcohol-penicilinas alfa-sustituidas, y sus sales, se preparan haciendo reaccionar ácido 6-amino-penicilánico, o una sal del mismo, con un ácido alcanóico alfa-sustituido o un derivado de éste que contenga el grupo cuya fórmula estructural se indica bajo estas líneas, o bien reaccionantes que lo formen *in situ*⁶⁷⁰.



R. hidrógeno, alcoholo, amino, nitro, ciano, hidroxilo o halógeno.
R¹. alcoholo.
X. oxígeno o azufre.

Estas nuevas alcohol penicilinas alfa-sustituidas pueden prepararse haciendo reaccionar ácido 6-amino-penicilánico con:

- El apropiado cloruro de alcanóilo sustituido, por ejemplo cloruro de alfa-fenoxi-propionilo.
- El anhídrido de ácido alcanóico sustituido, por ejemplo anhídrido de alfa-fenoxi-propionilo.
- Anhídridos mixtos, tales como anhídrido de t-butoxi-fórmico-alfa-fenoxi-propionilo.

También pueden prepararse mediante la reacción de ácido 6-amino-penicilánico con una carbodi-imida, tal como la 1,3-diciclo-hexil-carbodi-imida y el ácido alcanóico sustituido adecuado, por ejemplo ácido alfa-fenoxi-propiónico⁶⁷¹.

No obstante, se prefiere utilizar la reacción del ácido 6-amino-penicilánico con el cloruro de ácido alcanóico sustituido apropiado, como el cloruro de alfa-fenoxi-propionilo, en presencia de un aceptador ácido, a un pH comprendido entre neutro y moderado alcalino, ya que este procedimiento da rendimientos sustanciales del producto deseado. Preparadas de esta manera, las nuevas penicilinas resultan en forma de sus sales sódicas o potásicas; se convierten fácilmente, por neutralización con un ácido mineral, como podía ser ácido sulfúrico o clorhídrico, y se recuperan por filtración o centrifugación del ácido precipitado. Las formas ácidas de las nuevas penicilinas pueden ser convertidas fácilmente en sales por reacción con una base adecuada, por ejemplo el tratamiento de la penicilina deseada en solución acuosa con hidróxido amónico produce

⁶⁷⁰ Si R es hidrógeno, puede hacerse reaccionar el producto con una base que tenga un radical de sal no tóxica.

⁶⁷¹ Los autores citan, como materiales de partida, los siguientes: ácido alfa-fenoxi-propiónico, ácido alfa-fenil-mercapto-butírico, ácido alfa-fenoxi-butírico, ácido alfa-fenil-mercapto-valeriánico, ácido alfa-fenoxi-valeriánico, ácido alfa-fenil-mercapto-hexanoico, ácido alfa-fenoxi-hexanoico, ácido alfa-fenil-mercapto-octanoico, ácido alfa-fenoxi-heptanoico, ácido alfa-fenoxi-isobutírico, ácido alfa-fenil-mercapto-propiónico, ácido alfa-fenoxi-isovaleriánico, ácido alfa-fenil-mercapto-isobutírico y los cloruros y los anhídridos de estos ácidos. Los ácidos fenil-mercapto-alcanóicos se preparan mediante la reacción del ácido alfa-bromo-alcanóico deseado, por ejemplo ácido alfa-bromo-propiónico, con tiofenol, en solución neutra.

la sal amónica; de forma similar, se forman otras sales como las de calcio, magnesio, bario, potasio y sodio.

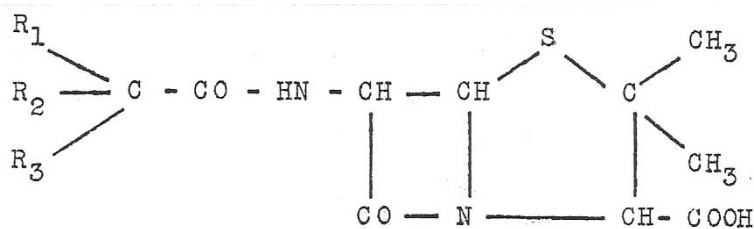
También se pueden preparar sales amínicas, como las sales de procaína, dibencil-amina, N,N"-dibencil-etileno-diamina, l-efén-amina y n-bencil-beta-fenetil-amina, al hacer reaccionar una solución de la penicilina apropiada, en un disolvente acuosa o no acuoso, con la amina deseada. Alternativamente, las sales amínicas se preparan en solución haciendo reaccionar una sal metálica de la penicilina adecuada, por ejemplo la sal sódica, con la sal ácida de la amina deseada, como podría ser el hidrócloruro de amina.

La introducción de las unidades de alcanoílo sustituidas, como el alfa-fenoxi-propionilo, que contienen un átomo de carbono asimétrico en la molécula de ácido 6-amino-penicilánico, origina una penicilina con un centro asimétrico en la cadena lateral, dando lugar a la formación de dos nuevas penicilinas epímeras. El producto aislado a partir de una determinada mezcla de reacción está constituido por la mezcla de dos compuestos estereoisómeros, ambos biológicamente activos⁶⁷².

El 29 de septiembre de 1960 es, de nuevo, una empresa danesa, *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, quien solicita, ante el registro de patentes español, la protección, por veinte años, de "Un método para la producción de penicilinas"⁶⁷³. Esta patente atañe al método de fabricación de una penicilina, de fórmula

⁶⁷² En la memoria descriptiva se proponen una decena de casos prácticos para ilustrar los métodos operatorios de este procedimiento; a modo de ejemplo, reseñamos el primero de ellos: a una solución de 30 g. de ácido 6-amino-penicilánico, 400 ml. de bicarbonato sódico al 3%, 200 ml. de acetona y 5 ml. de hidróxido sódico al 5 %, bien agitada, se le añade gradualmente, durante 1 hora, a una temperatura de 0° C, una solución de 20 g. de cloruro de alfa-fenoxi-propionilo en 100 ml. de acetona. El cloruro de alfa-fenoxi-propionilo se preparó a partir de ácido alfa-fenoxi-propiónico y cloruro de tionilo. Se adicionó hidróxido sódico para mantener el pH a 7,5; la mezcla se agitó a temperatura ambiente, durante media hora, después de completada la adición. A continuación se añadieron 200 ml. de agua y la solución se extrajo con un volumen igual de éter. La fase etérea se eliminó, la fase acuosa se llevó a un pH 2,5 por medio de ácido fosfórico y luego se extrajo dos veces con 230 ml. de metil-isobutil-cetona. Los extractos en metil-isobutil-cetona reunidos se extraen, después, con 300 ml. de agua, se añaden otros 300 ml. de agua y se ajusta el pH a 6,5 mediante la adición de dióxido potásico 5 N. La fase acuosa se separa y se seca por congelación. Se obtiene la sal potásica de alfa-fenoxi-etil-penicilina en forma de polvo. Se purifica la sal potásica y se obtiene en forma cristalina disolviendo en acetona:agua (4:1) a razón de 1 g. de polvo seco por 6,5 ml. de acetona:agua, añadiendo 19 ml. de acetona por gramo de polvo y dejando en reposo a temperatura ambiente. La sal potásica cristalina se filtra por succión, se lava con acetona y se seca al vacío. El análisis químico del producto cristalino seco, realizado por el método de la hidroxil-amina, indicó que el producto tiene una riqueza mayor del 99% de sal potásica de alfa-fenoxi-etil-penicilina. La rotación específica de una solución al 1% en agua es [alfa] 25/D = + 207.

⁶⁷³ AHOEPM, patente 261.363; la memoria descriptiva consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras; queda fechada en Madrid, a 29-IX-1960. Este expediente se corresponde al presentado en Gran Bretaña, el 30 de septiembre de 1959, bajo el número 33.222/59. La empresa figura establecida en el número 11 de Ballerup Byvej, Ballerup (Dinamarca). La patente española, de invención, fue aprobada con fecha de 4-III-1961 y publicada el 16-V-1961.



R₁. alcoholo inferior. / R₂. alcoholo inferior o aciloxi inferior. / R₃. alcoholo inferior que puede estar sustituido con ariloxi, un grupo arilo mono-nuclear, un grupo alcoxi o aralcoxi, un grupo fenoxi o tiofenoxi que puede estar sustituido con halógeno, alcoholo inferior, alcoxi, dialcohol-amino o dialcohol-amino-alcoholo, un grupo naftoxi que puede estar sustituido con halógeno, un grupo morfolino, un grupo fenil-sulfónilo, un grupo ureído o tío-ureído que puede estar sustituido con un arilo mono-nuclear o alcoholo inferior.

R₁ y R₂ pueden formar, junto con el átomo de carbono adyacente, un anillo de ciclopropilo. / R₂ y R₃ pueden formar, junto al átomo de carbono adyacente, un anillo que puede estar sustituido con un alcoholo inferior o arilo mono-nuclear.

El método, de acuerdo con los autores de esta memoria, comprende la operación de hacer reaccionar ácido 6-amino-penicilánico⁶⁷⁴ con cloruro de ácido, bromuro de ácido o un anhídrido de un ácido⁶⁷⁵, de fórmula general (R¹, R², R³)C-COOH, en donde R¹, R² y R³ tienen el significado que se ha especificado anteriormente.

Estas penicilinas se descomponen por penicilinas a una velocidad considerablemente menor que la bencil-penicilina, según prueban los ensayos realizados *in vitro*. Los autores incorporan a la memoria diferentes procesos con los que obtener ter-butil-penicilina⁶⁷⁶, alfa-fenoxi-isopropil-penicilina y alfa-(2,5-dimetil-fenoxi)-isopropil-penicilina.

⁶⁷⁴ Los autores de esta memoria remiten, como modo de obtener el ácido 6-amino-penicilánico, a la patente belga 569.728 y a una 'memoria descriptiva' correspondiente al número 257.814 que, en ningún caso, se corresponde con una patente española; este registro, en el caso español, está ocupado por un "Procedimiento para cortar una funda cilíndrica de revolución de un material maleable", presentado por el *Commissariat à l'énergie atomique*, con fecha de 3 de mayo de 1960.

⁶⁷⁵ El anhídrido puede ser un anhídrido mixto con otro ácido carboxílico, pero especialmente conviene aplicar el anhídrido mixto con un mono-éster de ácido carbónico, por ejemplo el éster mono-etílico.

⁶⁷⁶ A modo de ejemplo, nos ocupamos de la primera propuesta: una solución de 306 mg. de ácido trimetil-acético y 0,42 ml. de trietil-amina en 10 ml. de tetra-hidro-furano se enfrió a -10° C y, sobre la solución, se añadió, gota a gota, 0,3 ml. de cloro-carbonato de etilo, mientras se agitaba. Después de 10 minutos, la mezcla se enfrió a -30° C y, a continuación, se separó por filtración el hidro-cloruro de trietil-amina resultante. Sobre 3,5 ml. de filtrado se añadió una solución de 254 mg. de la sal potásica de ácido 6-amino-penicilánico en 3 ml. de agua. Añadiendo una solución acuosa diluida de KOH, se ajustó el pH de la solución a 7, se agitó a temperatura ambiente hasta que se alcanzaron 15° C, después de lo cual se mantuvo la agitación durante una hora más a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 12 ml. de butanol normal, y la mezcla se concentró, evaporando en vacío a temperatura ambiente a pequeño volumen, con lo cual se separó la sal potásica de ter-butil-penicilina. Después de añadir éter, se filtró la sal; el rendimiento alcanzado fue de 200 mg. con 87% de pureza; el espectro infrarrojo de la sal (en BrK sólido) acusó bandas de absorción intensas a 1208 cm⁻¹, 1246 cm⁻¹, 1327 cm⁻¹, 1396 cm⁻¹, 1505 cm⁻¹, 1612 cm⁻¹, 1680 cm⁻¹, 1730 cm⁻¹ y 1780 cm⁻¹. La sal de penicilina se sometió a un análisis cromatográfico sobre papel, por el cual se encontró el valor R_f [proporción a:c, donde a es la distancia, en el cromatograma, entre la línea de partida y la mancha producida por la sustancia en cuestión y c es la distancia entre la línea de partida y 'la línea frontal'] y se comparó con el encontrado, en ensayos paralelos, con cantidades iguales de las sales potásicas de bencil-penicilina y fenoxi-metil-penicilina, según los datos proporcionados por W.J. ROULSTON, L.F. HITCHCOCK. 1953. "Depletion of Gamma Isomer of Benzene Hexachloride in Cattle Dipping-Fluids". *Nature* 172: 546-547. Londres, 1953.

2.2.7.f. Fluoro penicilinas

Con fecha 13 de abril de 1961 la empresa norteamericana *Merck & Co. Inc.* presentó, en el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento para la obtención de fluoro-penicilina”⁶⁷⁷; estas nuevas alfa-fluoro-bencil-penicilinas poseen un amplio espectro de actividad antibiótica, son más estables en solución ácida que algunas de las penicilinas entonces conocidas [1961] y, administradas oralmente, permiten obtener niveles altos del antibiótico en sangre.

Los agentes acilantes apropiados para estas reacciones son los haluros de acilo, tales como el cloruro alfa-di-fluoro-fenil-acético y el cloruro alfa,alfa-di-fluoro-fenil-acético. En algunos casos, la acilación puede también efectuarse por el empleo de mezclas de anhídridos del ácido fenil-acético convenientemente sustituido. Esta etapa de acilación se realiza, también, por otros métodos bien conocidos en la técnica de las aminas acilantes. Generalmente es preferible que la reacción de acilación se lleva a cabo a temperaturas entre 0°-30° C y a un pH entre 5 y 9.

Para la preparación de las alfa-fluoro-bencil-penicilinas se acila el ácido 6-amino-penicilánico por medio del anhídrido, que se obtiene agitando vigorosamente ácido alfa-fluoro-fenil-acético y carbonato-cloro-isobutilo disuelto en una amina terciaria, tal como la trietil-amina, mientras se mantiene la mezcla de reacción a una temperatura relativamente baja, alrededor de 0° C. El anhídrido así formado se mezcla con ácido 6-amino-penicilánico en una solución de bicarbonato de sodio. Después de terminada la reacción de acilación, la mezcla de reacción se diluye con agua y se lava con éter. El pH de la solución se ajusta a 2 por acidificación y, el ácido libre de alfa-fluoro-bencil-penicilina, se extrae con metil-isobutil-cetona. La penicilina es posteriormente purificada por extracción en agua, manteniendo el pH a 6,5 con la cantidad requerida de bicarbonato de sodio acuoso. La extracción acuosa resultante de la sal sódica de alfa-fluoro-bencil-penicilina se lava con éter y se liofiliza para obtener el residuo: un sólido crudo que comprende la sal sódica de alfa-fluoro-bencil-penicilina.

La acilación del ácido 6-amino-penicilánico para producir alfa-fluoro-bencil-penicilina puede también efectuarse empleando el cloruro fenil-acético sustituido; este procedimiento es empleado particular y ventajosamente cuando el producto deseado es el compuesto alfa-alfa-di-fluoro-bencil-penicilina. Dado que el cloruro de alfa-alfa-di-fluoro-bencil-penicilina es altamente reactivo, el procedimiento de acilación preferido es aquel en el que se emplea un medio de reacción no acuoso, en el cual se hace reaccionar formaldehído seco con trietil-amina. Si el mono-fluoruro-bencil-penicilina correspondiente es el producto deseado, un modo adecuado de operar es mezclar el ácido 6-amino-penicilánico y el cloruro alfa-fluoro-fenil-acético en una mezcla acuosa de solución de bicarbonato al 3% y acetona. La sal sódica de fluoro-bencil-penicilina deseada puede, entonces, ser disuelta de la manera descrita para el método de preparación de mezcla del anhídrido. Después del aislamiento de la sal metálica del compuesto de penicilina deseado, el ácido libre puede ser obtenido por acidificación del producto aislado.

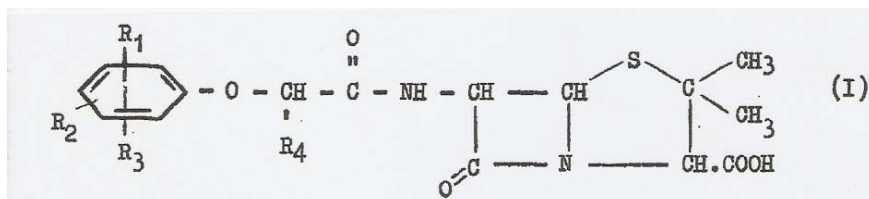
⁶⁷⁷ AHOEPM, patente 266.718; la memoria descriptiva consta de doce páginas escritas por una sola cara, a máquina; queda firmada el 13-IV-1961. La empresa figura como domiciliado en el 126 East Lincoln Avenue de Rahway (New Jersey. EE. UU.). La patente española fue concedida el 30-V-1961 y publicada el 16-VIII-1961.

Las sales metálicas preparadas de acuerdo con los procedimientos descritos pueden ser purificadas posteriormente, empleando un método que use sal de amonio insoluble. De esta manera, después de convertir la sal sódica en el ácido libre por acidificación, una sal de amino, como por ejemplo la sal N-etil-piperidina de alfa-fluoruro-bencil-penicilina, puede ser preparada por evaporación de una solución de alfa-fluoruro-bencil-penicilina y N-etil-piperidina en acetato de amilo y acetona hasta que queda un residuo parcialmente sólido. La sal N-etil-piperidina de alfa-fluoruro-bencil-penicilina se obtiene entonces por trituración del residuo semisólido con una pequeña cantidad de metil-isobutil-cetona; de manera similar, otras sales metálicas, como la sal potásica u otras sales amino, tales como la sal procaínica, pueden formarse por la reacción del ácido de penicilina libre con hexanoato de potasio 2-etilo, dando origen a la sal potásica de penicilina, o evaporando una solución del ácido libre de penicilina y procaína para formar la sal procaínica de penicilina.

Los autores exponen unos ejemplos que ilustran métodos para preparar alfa-fluoruro-bencil-penicilina, alfa,alfa-di-fluoruro-bencil-penicilina y sales alcalinas y aminas de las mismas⁶⁷⁸.

2.2.7.g Fenoxi-propil penicilinas

En 23 de mayo de 1960, la firma inglesa *Beecham Research Laboratories Limited* presentó, ante el registro español de patentes, una solicitud para proteger, por veinte años, un "Proceso para la preparación de ácidos de la fórmula general (1) y sales atóxicas de los mismos"⁶⁷⁹.



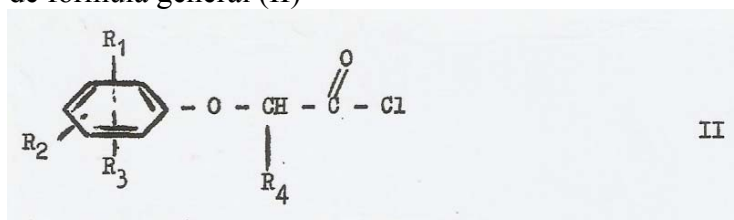
R₁, R₂ y R₃ son radicales, iguales o diferentes, cada una de ellos corresponde a un átomo de hidrógeno o un grupo nitro, amino o alquil-amino inferior; alquilo inferior; cloro, bromo o yodo; alcoxi inferior, hidroxil-sulfamilo, bencil, ciclohexil o fenilo. R₄ es un alquilo inferior fenilo.

⁶⁷⁸ Nos limitamos a señalar el primero de ellos, a modo de ejemplo: la preparación de alfa-fluoruro-bencil-penicilina: una cantidad de 46 mg. de ácido alfa-fluoruro-fenil-acético fue disuelta en 1 cm³ de acetona seca conteniendo 30 mg. de trietil-amina; esta solución fue enfriada a -5° C y se añadieron, agitando, 41 mg. de cloro-carbonato de isobutilo en 1 g. de acetona seca. Se dejó a -5 ° C, hasta que se formó el anhídrido; esta mezcla fue entonces añadida, agitando al mismo tiempo, a una solución enfriada de ácido 6-amino-penicilánico en 2,4 cm³ de NaHCO₃ al 3% y 1 cm³ de acetona. La acilación continuó a temperatura ambiente, con agitación, durante 30 minutos. La mezcla de reacción fue entonces diluida con pocos cm³ de agua y lavada con éter; se añadió ácido clorhídrico diluido a 0 ° C hasta que el pH fue del orden de 2. La penicilina liberada fue extractada tres veces con dos porciones de 2 cm³ de metil-isobutil-cetona. El extracto fue combinado y lavado varias veces con 2 cm³ de agua. La penicilina fue extractada con solución acuosa de NaHCO₃ al 3%, que se añadió, gota a gota, hasta que los extractos totales de agua presentaron un pH de 6,5. Este extracto acuoso fue lavado con éter y liofilizado. El sólido liofilizado que contenía alfa-fluoruro-bencil-penicilina se mostró activo frente a *Bacillus subtilis*.

⁶⁷⁹ AHOEPM, patente 258.322; la memoria descriptiva consta de 27 páginas mecanografiadas, numeradas y escritas por una sola de sus caras; como domicilio de la empresa se hace figurar Great West Road, Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente tiene, como prioridad, las solicitudes realizadas ante la Administración norteamericana: 815.287/59 [25-V-1959] y 847.874/59 [22-X-1959]. La memoria fue presentada ante la Administración española el 23-V-1960; concedida el 22-VI-1960 y publicada el 16-IX-1960.

Este procedimiento, desarrollado por el estadounidense Lee C. Cheney, trata de preparar nuevos compuestos sintéticos de penicilina: los ácidos 6-(2-fenoxi-propión-amido)-penicilánicos sustituidos y sus sales atóxicas.

La mayor parte de los agentes antibacterianos, como la bencil-penicilina, eficaces contra las bacterias gram-positivas, presentaban el inconveniente de ser inestables en medio acuoso e ineficaces contra numerosas bacterias denominadas 'resistentes'. Este proceso permite obtener compuestos producidos tras hacer reaccionar ácido 6-amino-penicilánico, a ser posible en forma de sal sódica o sal de trietil-amina, con un cloruro de fórmula general (II)⁶⁸⁰



R₁, R₂, R₃ y R₄ tienen el mismo significado que el señalado en la fórmula (I) o bien un equivalente funcional de los mismos como agente acilante para un grupo amino primario, incluyendo los correspondientes bromuros, ácidos carboxílicos, anhídridos ácidos y anhídridos mezclados con otros ácidos carboxílicos.

Uno de los procedimientos reseñados consiste en preparar un anhídrido mediante la mezcla de un ácido, cuyo cloruro corresponde a la fórmula II, con cloro-formiato de isobutilo y un hidrocarburo terciario o una amina alifática, tal como la trietil-amina, en un disolvente anhidro, preferentemente miscible con agua, como por ejemplo p-dioxano. Se enfría la mezcla; ya enfriada, se le añade una solución también enfriada de ácido 6-amino-penicilánico y una amina terciaria en agua, como puede ser la trietil-amina; se agita para formar la sal amónica sustituida del producto deseado. Los productos iniciales que no han reaccionado se extraen seguidamente, dejando el producto deseado en la fase acuosa. La fase acuosa es enfriada y acidulada mediante la adición de ácido mineral diluido. Se extrae el producto en forma de ácido libre, en un disolvente orgánico inmiscible con agua, como el éter, y se recupera.

Otra forma de esta invención consiste en tratar una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico, directamente con un cloruro ácido de fórmula tipo II; la mezcla se agita vigorosamente, a la temperatura ambiente, durante 20 a 60 minutos. Los productos iniciales, hidrolizados o no, son extractados con éter y se acidifica la solución acuosa en frío. La forma de ácido libre del producto se extrae con éter y el extracto se seca. El producto puede obtenerse de la solución etérea seca en forma de una sal insoluble en éter, tal como la sal potásica⁶⁸¹. Las condiciones de reacción incluyen temperatura cercana a la del ambiente, generalmente no superiores a 30° C; el pH ha de estar comprendido entre 6 y 9, controlado mediante el empleo de un amortiguador, tal como el carbonato sódico. La reacción puede llevarse a cabo en un medio acuoso o en un disolvente orgánico, como cloroformo, acetona y dioxanos.

⁶⁸⁰ El autor señala que un método de preparación del material inicial, el ácido 6-amino-penicilánico, es el indicado por Frank Ralph BATCHELOR, Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON. "Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations". *Nature*, 183: 257-258. Londres, 1959. Este ácido se emplea, en este procedimiento, bien en forma de sal metálica o bien como éster de un alcohol hidro-carbonílico.

⁶⁸¹ Según el autor, este procedimiento directo es especialmente útil cuando el cloruro ácido reacciona con una amina primaria más rápidamente que con el agua. El cloruro ácido puede ser sustituido por una cantidad equivalente del correspondiente bromuro o anhídrido ácido.

Los productos preparados de acuerdo con este procedimiento pueden aislarse mediante las técnicas usadas en la obtención de bencil-penicilina; estas técnicas incluyen la extracción en un disolvente con pH ácido, seguida de la recuperación por liofilización o precipitación en una solución acuosa en forma de sal amina insoluble en agua, o bien la recuperación directa de una solución acuosa por liofilización.

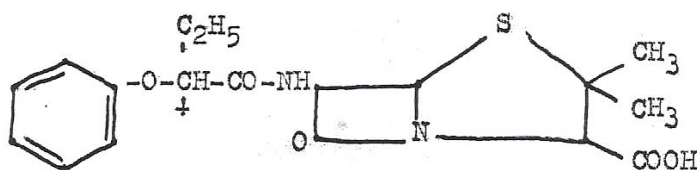
Un método apropiado de asilar el producto en forma de sal potásica cristalina comprende el extractado del producto de una solución ácida acuosa, por ejemplo a pH 2, en éter dietílico, secado del éter y adición de un equivalente, por lo menos, de una solución de 2-etil-exanoato potásico, en butanol seco. La sal potásica precipita en forma cristalina y se recoge por filtración o decantación.

Los compuestos obtenidos por este procedimiento puede considerarse, a *grosso modo*, como el resultado de la combinación del ácido 6-amino-penicilánico simple, isómero óptico de producción natural, con un ácido que contenga, por lo menos, un átomo de carbono asimétrico; cuando se usa un ácido racémico, el producto será una mezcla de los diastereoisómeros, ambos biológicamente activos; cada uno de los isómeros se prepara en forma pura, empleando la forma dextro o levo pura del ácido, o mediante separación física de la mezcla producida del ácido racémico.

Las sales atóxicas obtenidas por este procedimiento incluyen las sales sódicas, potásicas, cálcicas y aluminicas, sal amónica y sales amónicas sustituidas, por ejemplo, sales de trietil-amina o de procaína. Muchos de estos compuestos muestran, además, una cierta resistencia a su destrucción por ácidos o por penicilinas.

El 11 de agosto de 1961, la empresa norteamericana *Eli Lilly and Company* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, "Un procedimiento para la preparación de una nueva sustancia de penicilina"⁶⁸², caracterizado porque se hace reaccionar ácido 6-amino-penicilánico, o una sal del mismo, con ácido L(-)-alfa-fenoxi-n-butírico en forma de cloruro de ácido o anhídrido mixto, y se recupera el nuevo ácido 6-[L(-)-alfa-fenoxi-n-butiramido]-penicilánico.

Este procedimiento proporciona sales terapéuticamente útiles, en las que el ácido L(-)-alfa-fenoxi-n-butírico contiene un átomo de carbono ópticamente activo.



Entre las sales que pueden formarse por este procedimiento, los autores señalan las de sodio, potasio, calcio, aluminio, amonio, dibencil-etileno-dianima, procaína y otras sales amónicas sustituidas. Estas nuevas penicilinas presentan la propiedad de ser muy activas contra cepas de estafilococos resistentes a la penicilina y, por supuesto, son muy útiles para combatir los estafilococos sensibles a la penicilina; además, el L(-) diastereoisómero es muchas veces mas activo que el D(+) diastereoisómero relacionado.

⁶⁸² AHOEPM, patente 269.787; la memoria descriptiva consta de doce hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras; queda firmada, en Madrid, a 11-VIII-1961. El expediente se corresponde con el presentado ante la Administración norteamericana con fecha de 19-V-1961, bajo el numero 111.138/61. La empresa tiene fijado su domicilio en 70, South Albama Street, Indianapolis (Indiana. EE. UU.). La patente española fue aprobada el 30-IX-1961 y publicada el 16-XI-1961.

Para la preparación de estas nuevas penicilinas es conveniente partir del ácido DL-alfa-fenoxi-n-butírico⁶⁸³; éste se desdobla en sus isómeros ópticos de una manera normal, tal como por reacción con cinconina, estrionina, etc., cristalizando luego fraccionadamente para separar las sales diastereoisoméricas y, finalmente, acidificando para liberar el ácido L(-)-alfa-fenoxi-n-butírico deseado. El ácido L(-)-alfa-fenoxi-n-butírico purificado se convierte en el cloruro de ácido por los métodos habituales, por ejemplo por reacción con cloruro de sulfonilo, cloruro de axalilo, etc., teniendo cuidado de evitar condiciones extremas que pudieran dar lugar a la racemización. El cloruro de L(-)-alfa-fenoxi-n-butirilo así preparado se usa para acilar el ácido 6-amino-penicilánico.

Según el método descrito en esta memoria, el ácido 6-amino-penicilánico se disuelve con bicarbonato sódico en acetona acuosa 50:50 y el cloruro de ácido se añade sobre él mismo, transcurriendo la reacción a temperaturas ordinarias. La acetona se elimina de la mezcla del producto de reacción bajo vacío. La solución acuosa residual se acidifica a un pH *ca.* 2 por medio de ácido clorhídrico y se extrae con acetato de etilo o con otro éster. El resultado se trata con una solución acuosa de una base adecuada, tal como el hidróxido potásico, en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la mezcla de extracción a valores comprendidos entre 5 y 7. La penicilina deseada se obtiene de este modo en forma de una solución acuosa de la sal de la base empleada; el producto se obtiene en forma cristalina, evaporando a sequedad, disolviendo en agua, diluyendo con acetona, filtrando y secando. El ácido libre puede obtenerse, si así se desea, añadiendo clorhídrico sobre la sal, extrayendo con acetato de etilo o análogo y separando el disolvente de extracción por destilación en vacío.

Los autores señalan otra técnica, según la cual el ácido L(-)-alfa-fenoxi-n-butírico purificado se convierte en un anhídrido mixto por reacción con cloro-formiato de isobutilo, en presencia de un aceptor de hidrógeno tal como la trietil-amina, realizándose la reacción, bajo condiciones suaves, en un disolvente orgánico sustancialmente anhidro. La solución resultante se emplea para acilar el ácido 6-amino-penicilánico de una manera semejante a la indicada al emplear el cloruro de ácido en el proceso anteriormente descrito. La acilación del ácido 6-amino-penicilánico puede realizarse alternativamente con cloruro de DL-alfa-fenoxi-n-butirilo o anhídrido mixto, y la mezcla resultante de ácido 6-(D)-(+)-alfa-fenoxi-n-butiramido-penicilánico y ácido 6-[L(-)-alfa-fenoxi-n-butiramido]-penicilánico se separa por métodos conocidos, tal como por cristalización fraccionada, a partir de su solución⁶⁸⁴.

La L(-)-alfa-fenoxi-propil-penicilina y sus sales pueden administrarse, por vía parenteral u oral, en el tratamiento de una gran variedad de infecciones, tanto en humanos como en otros animales; es efectiva contra los estafilococos (incluyendo las cepas que son sensibles y resistentes a la penicilina G), estreptococos, *Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Bacillus anthracis* y, en

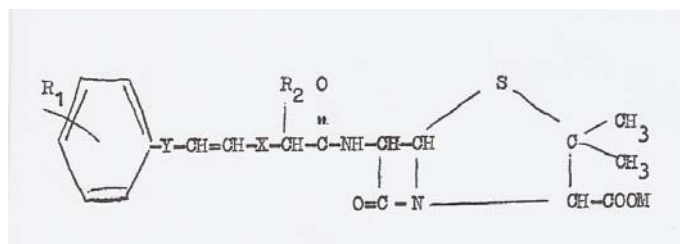
⁶⁸³ Los autores sugieren que puede prepararse por el método descrito en C.H. FAWCETT, Daphne J. OSBORNE, R.L. WAIN, Ruth D. WALTER. "Studies on plant growth-regulating substances: VI. Side-chain structure in relation to growth-regulating activity in the aryloxyalkylcarboxylic acids". *Annals of Applied Biology*, 40(2): 231-243. Londres, 1953.

⁶⁸⁴ La cristalización puede realizarse a partir de una solución acuosa concentrada de una sal de la mezcla, tal como la sal sódica o potásica, y la separación puede favorecerse añadiendo a ésta una sal soluble de igual catión, por ejemplo formiato, acetato, propionato, cloruro, nitrato, etc., de sodio o de potasio.

general, contra los patógenos gram-positivos. La dosificación terapéutica estará comprendida, ordinariamente, entre los límites de 1-10 mg./kg. de peso corporal⁶⁸⁵.

2.2.7.h. Fenil penicilinas

El 30 de septiembre de 1960, la empresa norteamericana *Chas. Pfizer & Co. Inc.* presentó una patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento de preparar ácidos penicilánicos”⁶⁸⁶; se trata de una serie de penicilinas, activas tanto por vía oral como por vía parenteral, que responden a la fórmula indicada bajo estas líneas



X o Y, pero no ambos, representan oxígeno o azufre, siendo entonces el otro radical un enlace directo entre átomos adyacentes. R₁, R₂, son hidrógeno o un radical metálico. M es amonio o amina.

⁶⁸⁵ Los autores proponen un par de ejemplos para aclarar, de manera práctica, este procedimiento; nos ocupamos del primero de ellos: se hizo reaccionar ácido alfa-fenoxi-n-butírico con un pequeño exceso molar de cinconina en etanol, a temperatura ambiente, el disolvente de la reacción se diluyó con un volumen igual de agua, y las sales diastereoisómericas se separaron por cristalización fraccionada. El L(-) isómero se liberó de su sal por acidificación con ácido clorhídrico y se extrajo en éter etílico, se secó y cristalizó; el ácido así obtenido tenía una rotación específica [alfa] 25/D de -51° medida en etanol (c=2). Se suspendió ácido L(-)-alfa-fenoxi-n-butírico (19,25 g.) en una mezcla de 80 ml. de dioxano y 40 ml. de acetona, y se añadieron 14,8 ml. de trietil-amina; la solución resultante se enfrió a 0° C. y, sobre ella, se añadió, gota a gota, agitando, una solución de 14,5 g. de cloro-formiato de isobutilo en 20 ml. de dioxano, en un periodo de 15 minutos, después de lo cual se continuó la agitación durante 10 minutos más a 0° C. El material de partida se convirtió así en el correspondiente anhídrido mixto del ácido L(-)-alfa-fenoxi-butírico. Se preparó una solución de ácido 6-amino-penicilánico disolviendo 23 g. de ácido 6-amino-penicilánico y 14,8 ml. de trietil-amina en 100 ml. de agua; esta solución se añadió rápidamente sobre la solución de anhídrido mixto y la mezcla de ración se dejó calentar a la temperatura ambiente, durante un periodo de dos horas. La mezcla del producto de reacción se diluyó con 300 ml. de agua, se lavó con 50 ml. de éter etílico, se trató con 200 ml. de acetato de etilo y se acidificó con ácido clorhídrico 1 N. La capa de acetato de etilo se separó y se extrajo de nuevo con 200 ml. de agua y una cantidad suficiente de solución acuosa de hidróxido potásico 1 N para ajustar la mezcla de extracción a pH 6,8. La fase acuosa se evaporó a sequedad en el vacío. Al residuo resultante se le añadió 1 litro de acetona; se originó un precipito cristalino. La papilla formada se refrigeró y se filtró, y el sólido obtenido se secó al vacío. El producto resultante, sal potásica del ácido 6-[L(-)-alfa-fenoxi-n-butiril]-amino-penicilánico, pesó 18 g. y tenía una rotación específica [alfa] 25/D de 202° en agua (c=1,58). La actividad antibacteriana fue de 567 unidades de penicilina G por miligramo, determinada por ensayo contra *Staphylococcus aureus* cepa 209 P.

⁶⁸⁶ AHOEPM, patente 261.390; esta memoria descriptiva consta de 16 hojas numeradas y escritas a máquina por una sola de sus caras; como domicilio de la empresa figura 11 Bartlett Street, Brooklyn (Nueva York. EE. UU.). El expediente, construido sobre uno similar con prioridad americana 843.932/59, de fecha 2-X-1959, fue presentado ante la Administración española el 30-IX-1960; la patente fue concedida en 9-XII-1960 y publicada el 16-I-1961.

Debido al doble enlace que poseen en la cadena lateral, estas nuevas penicilinas pueden existir como isómeros geométricos; se caracterizan por su velocidad de absorción alta y por sus elevados niveles iniciales en suero sanguíneo en el hombre⁶⁸⁷.

Los compuestos correspondientes a la fórmula anterior, en la que uno o más de los sustituyentes están unidos al metileno adyacente al grupo carboxílico, son también antibióticos valiosos⁶⁸⁸. Las penicilinas isómeras, 3-fenil-mercapto-2-propenil-penicilinas, en la cuales las posiciones de los grupos vinilo y azufre están intercambiadas, son útiles agentes terapéuticos, lo mismo que los compuestos correspondientes en los que están intercambiados vinilo y oxígeno.

Estos nuevos productos pueden prepararse a partir de ácido 6-amino-penicilánico, por cualquiera de los métodos conocidos para introducir un sustituyente acilo en una amina primaria; y por fermentación microbiana. Pueden prepararse por acilación del ácido 6-amino-penicilánico, utilizando la reacción de este ácido con el apropiado:

- a) cloruro del acilo sustituido, por ejemplo cloruro de trans-estiril-mercapto-acetilo.
- b) anhídrido de ácido sustituido, por ejemplo anhídrido de trans-estiril-mercapto-acetilo.
- c) anhídridos mixtos, tales como anhídrido t-butoxi-fórmico-trans-estiril-mercapto-acetilo.

También se pueden preparar haciendo reaccionar el ácido 6-amino-penicilánico con una carbodi-imida, como por ejemplo 1,3-dicloro-ciclohexil-carbodi-imida y el ácido alcanóico sustituido adecuado; son productos iniciales apropiados: ácido trans-estiril-mercapto-acético, ácido cis-estiril-mercapto-acético, así como los cloruros y anhídridos de los mismos.

Los cloruros de ácido no necesitan separarse de la mezcla de reacción; se obtienen resultados satisfactorios usando la mezcla obtenida después de la eliminación del disolvente de la reacción. También pueden prepararse por el método descrito por John C. Sheehan y Kenneth R. Henery-Logan⁶⁸⁹, donde se utiliza la reacción de d-penicilamina y t-butil-ftalimido-malón-aldehído, como reactivos iniciales. Los ácidos estiril-mercapto-acético isómeros se preparan a partir de fenil-acético y ácido tioglicólico. La preparación de estos compuestos por el método de la carbodi-imida se realiza tratando el ácido deseado (por ejemplo ácido trans-estiril-mercapto-acético) a un pH neutro, con ácido 6-amino-penicilánico, en presencia de 1,3-diciclo-hexil-carbodi-imida, en un sistema disolvente inerte, tal como tetra-hidro-furano acuoso, a una temperatura de 20° C.

Cuando las penicilinas se obtienen en forma de sal sódica o potásica se transforman en la forma ácida por neutralización con un ácido mineral, y se recuperan por filtración o centrifugación del ácido precipitado, que puede convertirse en sal por

⁶⁸⁷ Como ejemplo, los autores citan algunos datos sobre los niveles medios de penicilina en suero sanguíneo, obtenidos tras la administración de 24,50 mg. de trans-estiril-mercapto-metil-penicilina a un grupo de sujetos sometidos a ensayo.

⁶⁸⁸ Tales sustituyentes son alcohoilo inferior, alcoxilo inferior, hidroxilo, nitro, aciloxi, halógeno, fenoxi y carbetoxi. Son igualmente de valor terapéutico los compuestos en los que uno de los sustituyentes mencionados está presente en la unidad fenilo.

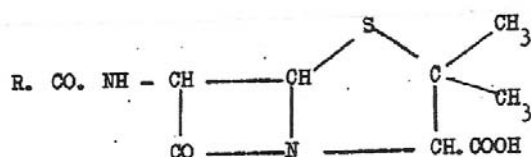
⁶⁸⁹ John C. SHEEHAN, Kenneth R. HENERY-LOGAN. "The total synthesis of Penicillin V". *Journal of the American Chemical Society*, 81(12): 3089-3094. Washington, DC. 1959.

reacción con una base adecuada. De manera similar se obtienen sales de calcio, magnesio, bario, potasio y sodio; también se preparan sales amónicas, como las sales de procaína o difenil-amina. Alternativamente, las sales amónicas se logran en solución acuosa, cuando se hace reaccionar una sal metálica con la sal ácida de la amina deseada, por ejemplo el hidrocloreto de amina.

Las esteril-oxi-metil-penicilinas análogas, en las que el oxígeno reemplaza al azufre en la cadena, se preparan de una forma similar; según los autores de esta memoria, también muestran actividad terapéutica valiosa.

El 18 de junio de 1963, de nuevo la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited*, presenta ante el registro español de patentes un expediente para proteger, por veinte años, su invención relativa a un "Proceso de preparación de penicilinas"⁶⁹⁰, diseñado por los británicos George Robert Fosker y Jonh-Herbet-Charles Nayler.

El procedimiento proporciona penicilinas que responden a la fórmula general señalada bajo estas líneas, y sus sales atóxicas⁶⁹¹.



R es un radical alifático aromático o heterocíclico.

El proceso comprende la reacción de un ácido, de fórmula general $R-COOH$ ⁶⁹², con N,N'-carbonil-di-imidazol o con N,N'-carbonil-di-triazol y la ulterior reacción del producto con ácido 6-amino-penicilánico. La reacción entre el compuesto carbonilo y el ácido $R-COOH$ se lleva a cabo, de manera preferente, en un disolvente inerte anhidro, tal como tetra-hidro-furano; luego se deja reaccionar el producto con una solución o suspensión acuosa o anhidra del ácido 6-amino-penicilánico, en presencia de una base inorgánica como el bicarbonato sódico o de una base orgánica como trietil-amina. La penicilina resultante se aísla en forma de sal, por las técnicas usadas con bencil-penicilina y fenoxi-metil-penicilina⁶⁹³.

⁶⁹⁰ AHOEPM, patente 289.148; la memoria descriptiva, que consta de siete páginas escritas a máquina, queda firmada, en Madrid, a 18 de junio de 1963; como domicilio social de la empresa figura Great West Road. Brentford (Middlesex. Inglaterra). La patente tiene prioridad británica bajo registro 25.174/62, de 30 de junio de 1962. La patente española fue concedida el 17-IX-1963 y hecha pública el 1-XI-1963.

⁶⁹¹ Estas sales son atóxicas e incluyen sales metálicas: sales sódicas, potásicas, cálcicas y aluminicas; también sales amónicas y sales amónicas sustituidas, y sales de aminas atóxicas tales como trietil-aminas (trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N-bencil-beta-fenetil-amina, 1-efén-amina, N,N'-bis-dehidro-abietileno-diamina) y otras aminas que hayan sido usadas para formar sales con bencil-penicilina.

⁶⁹² Entre los ejemplos de ácido $R-COOH$ se incluyen ácido fenil-acético y ácido alfa-amino-fenil-acético.

⁶⁹³ El producto puede extractarse en éter dietílico o n-butanol a un pH ácido y recuperarse luego por liofilización o por conversión de una sal insoluble en disolventes, o por neutralización con una solución en n-butanol de 2-etil-hexanoato sódico, o bien puede precipitarse a partir de una solución acuosa como sal insoluble en agua o una amina, o recuperarse directamente por liofilización, preferiblemente en forma de sal sódica o potásica. Cuando se forma la sal trietil-amina, se convierte el producto a la forma de ácido libre y desde ella a otras sales, a la manera empleada con la bencil-penicilina

Los autores proponen media decena de casos prácticos con los que perfilar su procedimiento; a través de ellos explican los mecanismos de obtención de alfa-ciano-bencil-penicilina⁶⁹⁴, alfa-carbonil-bencil-penicilina y alfa-(etoxi-tío-carbonil-amino)-bencil-penicilina.

El 5 de julio de 1963, el farmacéutico catalán José Robert Mestre⁶⁹⁵ presentó, ante el registro de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un

y otras penicilinas; el tratamiento de tal compuesto trietil-amínico, en agua, con hidróxido sódico, le convierte en la sal sódica, pudiendo retirarse la trietil-amina por extracción, por ejemplo empleando tolueno. El tratamiento de la sal sódica con ácido acuoso fuerte trasforma el compuesto a la forma ácida, que puede convertirse en otras sales amínicas, por ejemplo procaína, por reacción con la base amina; las sales así formadas son aisladas por liofilización o, si el producto es insoluble, por filtración. Un método de aislamiento de la penicilina con su sal sódica comprende la adición de ácido clorhídrico diluido a la mezcla de reacción, de manera que la fase acuosa tenga un pH de 2, y la posterior separación de esta fase de la orgánica; luego se lava la fase orgánica con más ácido clorhídrico diluido, después de lo cual se trata con porciones sucesivas de solución de bicarbonato sódico con una concentración tal que, en cada caso, la fase acuosa tenga un pH 7; los extractos acuosos de bicarbonato son combinados y lavados con agua, recuperándose finalmente la sal sódica por separación del agua mediante evaporación en vacío.

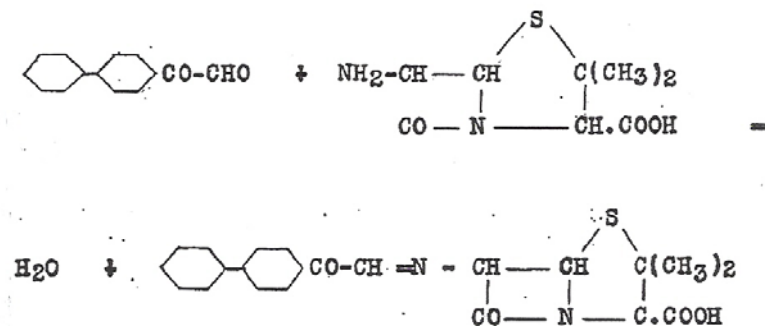
⁶⁹⁴ Nos ocupamos de este caso, a modo de ejemplo: se añadió una solución de N,N'-carbonil-dimidazol (0,01 moles) en tetra-cloruro seco a otra solución de ácido alfa-ciano-fenil-acético (0,01 moles) en el mismo disolvente; se apartó la mezcla a la temperatura ambiente hasta que cesó el desprendimiento de dióxido de carbono, y luego se mantuvo durante 30 minutos más. A continuación se añadió, con agitación, una mezcla de ácido 6-amino-penicilánico (0,05 moles), trietil-amina (0,01 moles) y dicloruro de metileno; se agitó la mezcla durante 4 horas, se trató con un volumen igual de agua y suficiente ácido clorhídrico diluido para dar una fase acuosa de un pH 2. Se separaron las capas y se lavó la fase disolvente con un ácido diluido (pH 2) y luego con agua. La solución residual de dicloruro de metileno fue agitada con tres porciones sucesivas de agua, a cada una de las cuales se añadió suficiente bicarbonato sódico para originar una fase acuosa de un pH 7. Los extractos acuosos combinados, conteniendo la sal sódica de la penicilina, fueron lavados con éter y luego evaporados a baja temperatura y presión. El sólido amarillo residual fue secado al vacío sobre pentóxido de fósforo para dar origen a la sal sódica cruda de alfa-ciano-bencil-penicilina, con una producción del 30%. El ensayo colorimétrico con hidroxil-amina contra una bencil-penicilina estándar indicó una pureza del 76%. El producto inhibió al *Staphylococcus* Oxford a una concentración de 0,1 mcg./ml.

⁶⁹⁵ José Robert Mestre (m. 1980) heredó la farmacia-laboratorio que levantara su padre, José Mestre, en el número 74 de la calle Lauria, en Barcelona; allí, al menos en la década de 1930, fecha en la que se anuncia en *El Boletín de la Revista Ibero-Americana de Ciencias Médicas*, preparaba 'Arphos Robert', un reconstituyente inyectable, a base de cacodilato, fósforo y estricnina, 'Natrocital', comprimidos y granulados antidiarréicos, 'Peptoyodal', un yodo orgánico en líquido e inyectable y 'Phosphorrenal', un reconstituyente en gránulos, elixir e inyectables (cf. *El Boletín de la Revista Ibero-Americana de Ciencias Médicas*, 6(60): [s.p.] Barcelona, 1931 *Ib.*, 9(100): 68, 70, 71. Barcelona, 1934). Ramón JORDI GONZÁLEZ (*Colectanea de 'speciers', mancebos boticarios, boticarios, farmacéuticos practicantes de farmacia y farmacéuticos en Cataluña (1207-1997)*. Barcelona: Fundación Uriach, 2003 - cf. pág. 746-) le sitúa activo en esta localización entre 1932 y 1941; durante la guerra, sirvió en el bando afín al general Franco; fue contador de la Comisión gestora del Colegio de Farmacéuticos de Barcelona (1939-1941) y vocal en la Junta del Colegio, en representación de los laboratorios farmacéuticos, entre 1952 y 1959. *Laboratorios Robert* gozó de una amplia presencia nacional durante la década de 1970; el 20 de enero de 1973 se celebró, en Sevilla, una convención del personal del Laboratorio, de la que da cuenta las páginas del diario *ABC*.

Su presencia en el archivo de patentes se hace visible desde diciembre de 1953, entonces presentará "Un nuevo procedimiento de fabricación de 3,5-pirazolidonas" (AHOEPM, patente 212.764), al que seguirá, en julio de 1954 "Un nuevo método de preparación de 7-(beta-gamma-dihidroxi-propinil)-teofilina" (AHOEPM, patente 216.454), en octubre y noviembre de 1957 sendos "Nuevo procedimiento para la fabricación de sales puras del ácido-pantoténico, para uso inyectable" (AHOEPM, patentes 238.012, 238.846), en enero de 1958 "Nuevo procedimiento para la fabricación de sales cálcicas complejas de estreptomina y dedihidro-estreptomina" (AHOEPM, patente 239.873), en julio de 1959 "Un procedimiento para la fabricación de un nuevo derivado sulfamídico" (AHOEPM, patente 250.598);

“Procedimiento para la obtención de una nueva penicilina”⁶⁹⁶, obtenida a partir de ácido 6-amino-penicilánico y de 4-difenil-glioxal⁶⁹⁷, a la que el autor confiere propiedades antivirales.

La condensación entre 4-difenil-glioxal y ácido 6-amino-penicilánico se representado en el esquema:



La obtención de este compuesto se produce al disolver el 4-fenil-glioxal en un disolvente orgánico miscible con una solución acuosa de una sal soluble del ácido 6-amino-penicilánico. La reacción suele producirse a temperatura ordinaria, con ligera elevación de grados. La mezcla de reacción, al principio, es incolora o a lo sumo ligeramente amarillenta, al poco tiempo se vuelve fuertemente amarilla, virando al cabo de 20 minutos al color naranja. El final de la reacción se aprecia cuando una muestra de la masa de reacción diluida con agua no da ningún precipitado, lo cual demuestra que el 4-difenil-glioxal, prácticamente insoluble en agua, ha entrado completamente en reacción con la sal de trietil-amina del ácido 6-amino-penicilánico, con formación de una nueva penicilina⁶⁹⁸.

de marzo de 1961 data su “Procedimiento para la fabricación de un nuevo derivado de la antipirina” (AHOEPM, patente 266.061); en julio de 1963 volverá a registro, esta vez con un “Procedimiento para la obtención de una nueva penicilina” (AHOEPM, patente 289.688) que es el que nos atañe y, en agosto de 1963, con “Un procedimiento de fabricación de una amida del ácido 6-amino penicilámico” (AHOEPM, patente 291.104) del que hemos de ocuparnos luego. En el marzo de 1964 patentó un “Procedimiento para la obtención de un anestésico de síntesis” (AHOEPM, patente 297.931).

⁶⁹⁶ AHOEPM, patente 289.688; la memoria descriptiva consta de cinco hojas foliadas, escritas a máquina, firmadas en Madrid, a 5 de julio de 1962. El solicitante figura como residente en Barcelona, calle de Valencia nº 314; era ésta la dirección a la que, en 1947, había trasladado el antiguo laboratorio anejo de la calle Lauria, al transformarlo en independiente (cf. JORDI GONZÁLEZ, *cit. ut supra*). La patente fue concedida el 10-VII-1963 y publicada el 1-XI-1963.

⁶⁹⁷ Un procedimiento para la fabricación de 4-difenil-glioxal está protegido por la patente española 266.061, propiedad de José Robert Mestre (cf. *supra*).

⁶⁹⁸ El autor presenta un caso práctico: 4,2 g. de 4-difenil-glioxal-hidrato se disuelven en 40 cm³ de N-N-dimetil-formamida; a esta solución, ligeramente enfriada, se agregan 3,5 g. de ácido 6-amino-penicilánico, previamente disueltos en 5 cm³ de agua, con la correspondiente cantidad de trietil-amina, hasta alcanzar un pH 8. Si al añadir la solución del ácido 6-amino-penicilánico se aprecia un enturbiamiento, se agregan unas gotas más de dimetil-formamida, comprobando el pH -éste debe estar comprendido entre 7 y 7,5, si no fuera así, se ajusta con unas gotas de trietil-amina-. La masa de reacción adquiere rápidamente una coloración amarilla intensa que vira al naranja al cabo de media hora. La reacción se considera terminada cuando una muestra del producto, diluida con agua, no acusa la presencia de ningún precipitado. Se diluye con 200 cm³ de agua y se enfría a 0° C; se acidifica hasta un pH 2 con ácido sulfúrico normal. El precipitado se extrae con 30 cm³ de acetato de butilo⁶⁹⁸. El extracto se lava con un poco de agua helada; se interponen 50 cm³ de agua y se agrega una solución de bicarbonato sódico hasta alcanzar un pH de 6,7 en la fase acuosa; el extracto acuoso, que contiene la sal sódica de la nueva penicilina, se separa, se lava con éter y se precipita la sal de dibencil-etilén-diamina con una solución

En definitiva, el autor propone un procedimiento para la obtención de una nueva penicilina, partiendo de una disolución del 4-difenil glioxal que se añade a la temperatura ordinaria a una sal hidrosoluble del ácido 6-amino-penicilánico, se logra así el correspondiente producto de condensación que constituye la nueva penicilina, la cual se procede a separar del medio en que se forma, primero por dilución, segundo acidificando hasta pH 2 y, tercero, por extracción con acetato de butilo, acetato de amilo u otro disolvente orgánico no miscible con el agua, que disuelve la mencionada penicilina al estado ácido, pasando a su sal sódica mediante una solución alcalina.

2.2.7.i. *Acil-amino penicilinas*

Con fecha 11 de noviembre de 1960, la empresa alemana *Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft* presentó, ante la Administración española, una patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento para la obtención de ácidos 6-acilamino-penicilánicos”⁶⁹⁹. Los autores mantienen que se pueden obtener algunos ácidos 6-acil-amino-penicilánicos, con un buen rendimiento, si el ácido 6-amino-penicilánico reacciona con ésteres del ácido carbónico de los compuestos hidroxí-, mercapto- o sus derivados en presencia de bacterias, de extractos de ellas o de enzimas que sean capaces de ligar, en forma amídica, el ácido fenil-acético con el grupo amínico del ácido 6-amino-penicilánico.

Los compuestos de hidroxí- y mercapto-, usados en la invención, son alcoholes, mercaptanos, fenoles y tío-fenoles⁷⁰⁰. Son de importancia los ésteres del ácido carbónico de aquellos alcoholes y mercaptanos que, a su vez, llevan grupos carboxílicos, como por ejemplo el éster del ácido carbónico o de los ácidos glicólico y tío-glicólico. La presencia de enzimas es necesaria, pues los ésteres del ácido carbónico, en medio acuoso, a pH de 4 a 8, no son capaces de acilar el ácido 6-amino-penicilánico a los derivados 6-acílicos deseados⁷⁰¹; no es necesario aislar las enzimas inductoras de la síntesis, se pueden utilizar células de bacterias que contienen estos enzimas como agentes realizadores de la reacción. Los autores incluyen en la memoria algunos casos prácticos⁷⁰².

acuosa de acetato de dibencil-etilén-diamina. Se filtra la sal insoluble, se lava con agua y se deseca en un desecador sobre ácido sulfúrico. Se obtuvieron 56 g. de la nueva sal, de color amarillo-naranja.

⁶⁹⁹ AHOEPM, patente 262.353; la memoria descriptiva consta de ocho hojas, escritas a máquina por una sola cara; como domicilio de la empresa figura Leverkusen-Bayerwerk (Alemania). El expediente fue construido sobre otro similar, de prioridad alemana 30.003/59, aprobado con fecha de 4-XII-1959; fue presentado el 11-XI-1960, concedido el 7-XII-1960 y publicado el 16-I-1961.

⁷⁰⁰ Como ejemplos de alcoholes pueden emplearse etanol, butanol o ciclo-hexanol; mercaptanos adecuados son mercapto-benzo-tiazol, ácido tío-glicólico, ácido 2-mercapto-butírico y cisteamina; como fenoles o tío-fenoles se pueden utilizar fenol, ácido p-oxi-benzoico, tío-fenol o tío-cresol.

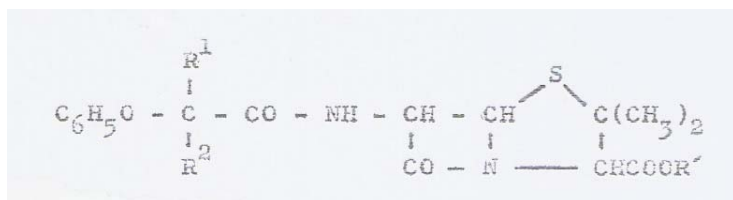
⁷⁰¹ Por ejemplo, el ácido alfa-fenoxi-propionil-tioglicólico, tratado a un pH de 4 a 8 con 6-amino penicilánico, no origina ningún ácido alfa-fenoxi-propionil-6-amino-penicilánico; pero si se adiciona una solución enzimática a la obtención del compuesto indicado, la reacción se efectúa rápidamente y con gran rendimiento.

⁷⁰² En la serie de ejemplos propuestos por los autores, el primero sirve de referencia a todos los demás, es éste: una solución de 160 litros de agua de esponjamiento de maíz, al 2% en volumen, que contiene 0,2% de acetato fenólico, se ajusta a un pH de 7,0 con hidróxido potásico; se calienta durante 30 minutos a 120° C; se deja enfriar y se clarifica la solución por centrifugación; se esteriliza durante 40 minutos a 110° C en el fermentador; el caldo obtenido se enfría, después se le inyecta con 400 cc. de un cultivo de *Escherichia coli* ATC 11105; el preparado es ventilado con 150 l. aire/minuto, agitándolo a 150 revoluciones/minuto; se cultiva durante 17 horas a 31° C; durante todo el tiempo del crecimiento se

Con fecha 20 de diciembre de 1961, la empresa danesa *Novo Therapeutics Laboratorium A/S* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente destinado a proteger un “Procedimiento para la preparación de derivados n-acilo del ácido 6-amino-penicilánico”⁷⁰³, mediante el cual se hace reaccionar una solución en disolvente orgánico de una sal de amonio cuaternario del ácido 6-amino-penicilánico, con un agente de acilación.

El objeto de este procedimiento es hacer uso de un agente de acilación de un tipo diferente al utilizado hasta entonces, así como llevar a cabo la acilación, y el correspondiente aislamiento de los derivados N-acilados, en condiciones en las cuales se obtengan estos derivados con alto rendimiento y en un estado de gran pureza.

Los derivados N-acilo del ácido 6-amino-penicilánico, a los que este procedimiento se refiere⁷⁰⁴, tienen por fórmula general la indicada bajo estas líneas



R' representa un hidrógeno o un radical formador de sales o ésteres.

R¹ representa un grupo alcoholilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono.

R² tiene el mismo significado que R¹ o representa un hidrógeno.

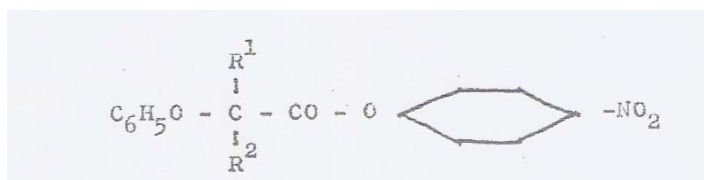
Es una característica de este procedimiento el utilizar como agente acilante un éster p-nitro-fenílico, cuya fórmula general se indica más abajo

introducen en el cultivo 5 l. de dióxido de carbono por minuto. Las células de las bacterias se centrifugan de la solución de cultivo, se lavan con 16 l. de solución amortiguadora de fosfato 1/15 m. de pH 6,0; después de centrifugar, se vuelve a suspender en solución de fosfato. A esta suspensión se le agregan 0,125% de ácido 6-amino-penicilánico, 0,5% de ácido alfa-fenoxi-propionil-tioglicólico y 0,1% de tolueno. La mezcla de reacción se ajusta entonces con una solución de sosa concentrada a pH 6,5 y se guarda, durante una hora, a 37° C. El preparado contiene 884 unidades de actividad penicilínica por centímetro cúbico; esta actividad es debida al ácido alfa-metil-fenoxi-acetilo-6-amino-penicilánico formado por la reacción racémica.

Obtención del ácido alfa-fenoxi-propionil-tioglicólico: una cantidad de 9,2 g. de ácido tioglicólico es disuelta en 200 cc. de sosa cáustica al 4,4%; a esta solución se le añaden, mediante la introducción de nitrógeno, con buena agitación, a una temperatura comprendida entre 0° y 5° C, una cantidad de 18,4 g. de cloruro del ácido alfa-fenoxi-propiónico, en un tiempo de 30 minutos; se agita durante dos horas, a 20° C, y se acidifica con ácido clorhídrico. Se forma un aceite que se extrae con éter; después de secar y evaporar el éter, se obtienen 22,9 g. de ácido alfa-fenoxi-propionil-tioglicólico que es un aceite viscoso, se deja reposar durante mucho tiempo y cristaliza; presenta un punto de fusión de 52° C.

⁷⁰³ AHOEPM, patente 273.089; la memoria descriptiva consta de 8 hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras; como domicilio de la empresa figura el número 115 Fuglebakkevej, Copenhague (Dinamarca). El expediente, firmado en Madrid, fue construido sobre el aprobado por la Administración británica bajo el número 42.570/60, de fecha 9-XII-1960; fue presentado ante la Administración española el 20-XII-1961, concedido el 2-I-1962 y publicado 1-II-1962.

⁷⁰⁴ Entre los derivados N-acilo que se pueden preparar por este procedimiento figuran los siguientes: ácido 6-(alfa-fenoxi-propin-amido)-penicilánico y ácido 6-(alfa-fenoxi-isobutil-amido)-penicilánico, y también sus sales y ésteres.



R¹ representa un grupo alcoholilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono.

R² tiene el mismo significado que R¹ o representa un hidrógeno.

Anteriormente se había propuesto un procedimiento para preparar ésteres p-nitro-fenílicos de aminoácidos N-bloqueados, y luego hacer reaccionar estos ésteres con otro aminoácido, con lo cual se formaba un enlace peptídico; se consideró como necesario el proteger el grupo carboxílico del amino-ácido segundo por esterificación. Los autores señalan que esto es innecesario si se emplean, para la acilación del ácido 6-amino-penicilánico, ésteres p-nitro-fenílicos cuya fórmula general se ha indicado líneas arriba.

Otra característica de este procedimiento consiste en adicionar una amina terciaria como catalizador para conseguir la acilación; incluso se puede obtener un incremento muy notable del rendimiento del proceso que, según informan los autores, puede ser del 75% al 95% del teórico. Además, este procedimiento se realiza de una manera satisfactoria sin usar un catalizador, aunque se puede emplear una amina terciaria como tal⁷⁰⁵.

Como durante el proceso de acilación se forma p-nitro-fenol, este compuesto ha de ser eliminado por disolución en agua de la mezcla de reacción, después de haber eliminado el disolvente orgánico empleado para ajustar la solución acuosa a un pH de 4,5 a 5,5, preferiblemente a 5; entonces se elimina p-nitrofenol por extracción con un disolvente orgánico como el éter. La acilación, según este procedimiento, se puede realizar en varios disolventes orgánicos como piridina, cloroformo o dioxanos⁷⁰⁶.

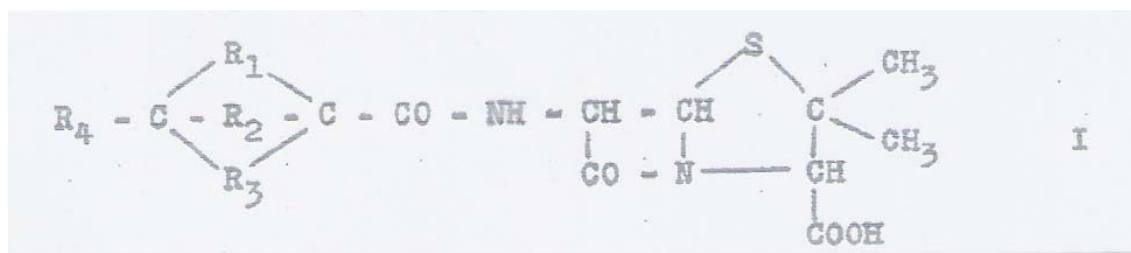
El 25 de enero de 1963 la empresa suiza *J. R. Geigy A.G.* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente destinado a proteger un "Procedimiento para

⁷⁰⁵ La amina terciaria empleada como catalizador puede ser igual o diferente de la amina terciaria que forma parte de la sal de amonio del ácido 6-amino-penicilánico utilizado; se pueden emplear las trialcoholil-aminas con cuatro átomos de carbono en el grupo alcoholilo, como N-metil-piperidina y N-metil-morfolina.

⁷⁰⁶ Los autores ilustran su procedimiento con un par de ejemplos: en el primero forman la sal sódica del ácido 6-(alfa-fenoxi-propión-amido)-penicilánico: una cantidad de 2,9 g. del éster p-nitro-fenílico del ácido alfa-fenoxi-propiónico, se mezclan en 25 ml. de piridina seca, 1,0 g. de trietil-amina y 1,0 g. de ácido 6-amino-penicilánico (pureza 85%); la mezcla se agita y luego se deja en reposo de 15 a 18 horas. Se separa piridina por destilación al vacío; el residuo formado se disuelve en 70 ml. de agua; se ajusta el pH de la solución a 5; la solución se extrae tres veces con éter. Se acidifican las soluciones acuosas recogidas y separadas, hasta un pH de 2, extrayendo con cloroformo; se añaden 50 ml. de agua a la fase de cloroformo y se lleva el pH de la fase acuosa hasta 7, por adición de una solución de bicarbonato sódico, este procedimiento se repite con más agua (30 ml.). Las fases acuosas neutras, que contiene la sal de sodio del ácido 6-(alfa-fenoxi-propión-amido)-penicilánico, se secan por congelación y se obtiene la sal sódica, con un rendimiento de 94%

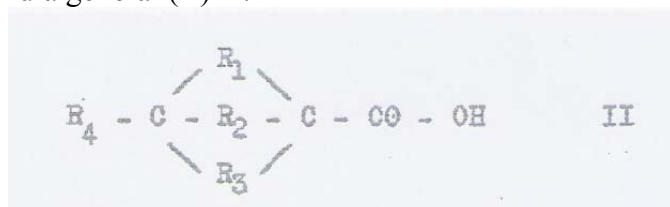
En el segundo ejemplo forma la sal sódica del ácido 6-(alfa-fenoxi-isobutil-amido)-penicilánico: se mezclan 3,0 g. del éster p-nitro-fenílico del ácido alfa-fenoxi-isobutírico en 25 ml. de dimetil-formamida seca, con 1,0 g. de trietil-amina y 1,0 g. de ácido p-amino-penicilánico (85% de pureza). La mezcla se agita durante un tiempo y se deja en reposo, a la temperatura ambiente, durante 18 horas; la dimetil-formamida originada se elimina por destilación. Se opera con el residuo tal y como se indicó en el ejemplo anterior; el rendimiento de la obtención de sal es del 77%.

la preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico⁷⁰⁷. Señalan los autores que compuestos de la fórmula general como la señalada bajo estas líneas, así como sus sales amónicas, alcalinas y alcalinotérreas y sus sales con bases orgánicas, presentan efectividad antibacteriana frente a bacterias gram-positivas⁷⁰⁸.



R₁ y R₂ corresponden a radicales de mono- a tetra-metileno o alqueno con 4 átomos de carbono a lo sumo que, a su vez, pueden estar sustituidos por radicales alquilo inferiores, átomos de halógenos y/o radicales oxo, y también pueden enlazarse entre si. / R₃ significa el enlace directo o un radical del tipo R₁ y R₂. / R₄ corresponde a un hidrógeno, un átomo de halógeno, el grupo hidroxilo, el grupo carboxi, un grupo alquilo, alcoxi, carbalcoxi inferior o al radical fenilo.

Los compuestos de fórmula general I se obtienen al hacer reaccionar ácido 6-amino-penicilánico, o una de sus sales, con un compuesto capaz de introducir el radical de una sal de fórmula general (II)⁷⁰⁹.



Estos compuestos son haluros, anhídridos y anhídridos mezclados⁷¹⁰, en presencia de agentes fijadores de ácidos; los ácidos libres en presencia de agentes

⁷⁰⁷ AHOEPM, patente 284.536; la memoria descriptiva consta de 19 hojas foliadas y escritas a máquina, por una sola cara; se basa en el expediente de prioridad suiza 977/62 [26-I-1962]. Como domicilio social de la empresa figura solamente Basilea (Suiza). La solicitud fue firmada, en Madrid, a 25 de enero de 1963, concedida el 20-II-1963 y publicada el 1-VII-1963.

⁷⁰⁸ La actividad biológica de los compuestos preparados según este procedimiento se ha comprobado mediante la prueba de incorporación de agar señalada en Howard FLOREY, Ernst-Boris CHAIN, N. G. HEATLEY, M. A. JENNINGS, A. G. SANDERS, Edward-Penley ABRAHAM, Mary Ethel FLOREY. *Antibiotics. A survey of penicillin, streptomycin and other antimicrobial substances from fungi, actinomycetes, bacteria and plants*. Londres: Oxford University Press, 1949. A esta prueba de incorporación se transfiere un cultivo micro-orgánico; el cultivo previamente se incubó durante 24 horas a 37° C con un pistón recubierto de terciopelo sobre una lámina de agar estéril. El antibiótico a ensayar se presenta con una concentración determinada. La concentración de antibiótico que impide el desarrollo de las bacterias se nombra como concentración retardatriz mínima.

⁷⁰⁹ Como ácidos de fórmula general II se pueden citar: ácido adamantan-1-carboxílico, ácido d,1-cetopínico, ácido triciclénico, ácido camférico; compuestos bicíclicos obtenidos sintéticamente con el ácido biciclo (2,2,2)-oct-2-en-1-carboxílico y ácido decalín-9-carboxílico. Entre las sales empleadas cabe citar las sales de sodio, potasio, litio, amonio o calcio; sales de bases orgánicas como la trietil-amina, dietanol-amina, N-etil-dietanol-amina, pirrolidona, piperidina, N-etil-piperidina, p-bencil-amina, dibencil-amina y otras aminas usadas frecuentemente en la preparación de sales de penicilina.

⁷¹⁰ Los autores, con la expresión 'anhídridos mezclados de ácidos de fórmula general (II)' entienden, por una parte, ácidos alcanóicos inferiores, en especial ácido acético y, por otra parte, anhídridos con semiésteres de ácido carbónico, que se pueden obtener mediante la reacción de ácido de fórmula general II con bencil-éster, p-nitro-bencil-éster, isobutil-éster, etil-éster o metalil-éster de ácido clorofórmico.

fijadores de agua, así como azidas y ésteres activos, como por ejemplo ciano-metil-éster y p-nitro-fenil-éster⁷¹¹.

El aislamiento de los productos de reacción en medios acuoso-orgánicos se realiza al acilar en caliente y fijar el ácido 6-amino-penicilánico, que precipita en un disolvente orgánico no miscible con agua. El citado ácido puede extraerse con una solución acuosa de bicarbonato sódico o potásico. La solución acuosa de la sal sódica o potásica del ácido 6-acilo-penicilánico se concentra por liofilización al vacío y a temperaturas bajas. Si las sales se han formado con bases orgánicas, se pueden aislar tratando con bases orgánicas adecuadas las soluciones citadas en disolventes orgánicos, después se ha de separar y secar las sales que precipitan. Se pueden asilar las sales del ácido 6-acil-amino-penicilánico directamente, en el medio de reacción orgánico, por extracción mediante soluciones acuosas de bicarbonato sódico o potásico. También es posible realizar este proceso por precipitación con bases orgánicas. Los autores explican, mediante unos ejemplos prácticos, la preparación de estos nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico⁷¹².

El 8 de marzo de 1963, la empresa suiza *J. R. Geigy A.G.* presentó, ante la Administración española, un expediente para proteger una patente de invención relativa a un “Procedimiento para la preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico”⁷¹³, que poseen, frente a las bacterias gram-positivas, una acción que se extiende a los géneros de bacterias resistente a la penicilina G; además estos compuestos son estables frente a ácidos minerales⁷¹⁴.

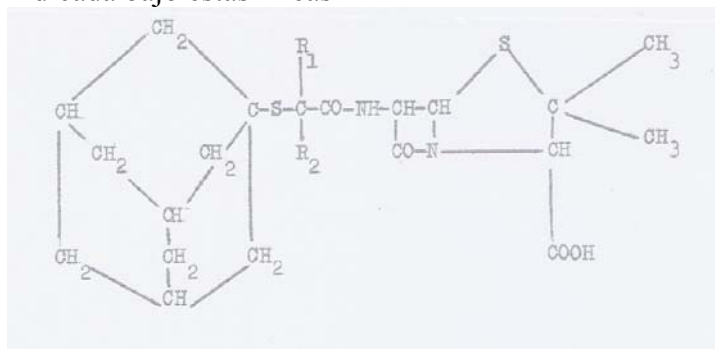
⁷¹¹ En este método se usan, como agentes fijadores de ácidos, bicarbonato sódico y bicarbonato potásico, carbonato sódico y carbonato potásico; hidróxido sódico e hidróxido potásico en medio orgánico o acuoso-orgánico; las bases terciarias orgánicas como trietil-amina o piridina en medio orgánico, por ejemplo en dioxanos, tetra-hidro-furano, acetona y cloroformo. Como fijadores de agua se puede citar carboxi-imida-diciclo-hexílica.

⁷¹² Del conjunto de ejemplos que propone la memoria descriptiva hemos seleccionado el primero de ellos: una cantidad de 1,16 g. de ácido 6-amino-penicilánico al 81% se mezcla con 25 cc. de agua destilada que contiene 3 g. de bicarbonato sódico. La solución se enfría de 0° a -5° C; se adiciona, gota a gota, 0,92 g. de cloruro del ácido adamantan-1-carboxílico, disueltos en 25 cc. de acetona; se agita durante una hora a la temperatura ambiente; el valor de su pH es de 8,6; se filtra mediante algodón en rama, el filtrado se lava dos veces con 5 cc. de metil-isobutil-cetona; se regula su pH a 2,1 por medio de ácido sulfúrico 2 N tras succión en capas de 15 cc. de metil-isobutil-cetona, agitando fuertemente; las fases se separan; la capa acuosa se extrae con 5 cc. de metil-isobutil-cetona. Las soluciones de metil-isobutil-cetona, juntas, se lavan con 5 cc. de agua y se tratan con solución de bicarbonato sódico al 3%, hasta conseguir un pH de 6,8-7,0. La fase orgánica se extrae con 59 cc. de agua; las porciones acuosas se unen y se lavan con 25 cc. de éter. La solución acuosa del producto se libera del éter disuelto; seguidamente se congela en mezcla de hielo seco y acetona y, en este estado, se concentra al vacío. La sal sódica del ácido 6-(adamantan-1'-carboxamido)-penicilánico se presenta como un polvo voluminoso y blanco, débilmente higroscópico. Este producto inhibe, en la prueba de incorporación, el desarrollo de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0,15 gammas/cc. y el desarrollo de *Staphylococcus aureus* 5003 a una concentración de 0,62 gammas/cc.

⁷¹³ AHOEPM, patente 285.853; la memoria descriptiva consta de dieciocho hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras; como domicilio empresarial figura Basilea (Suiza). La memoria se basa sobre un expediente de patente suiza, 2.879/62, con prioridad de 9-II-1962. La memoria presentada ante el registro español fue firmada en Madrid, el 8 de marzo de 1963, presentada ese mismo día, concedida el 6-VII-1963 y publicada el 16-VIII-1963.

⁷¹⁴ Estos compuestos se descomponen menos que el promedio de las sustancias similares, por acción de varias horas (3 a 10 horas) de ácido clorhídrico acuoso de pH 2, entre 20°-25° C.

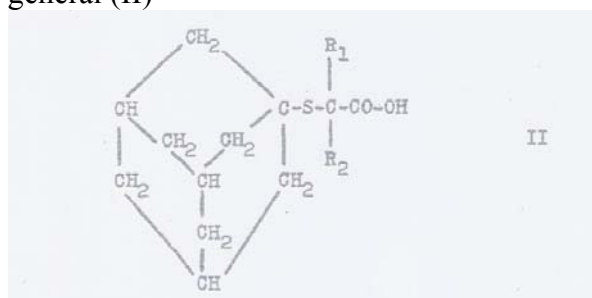
Los compuestos obtenidos por este procedimiento tienen por fórmula general la indicada bajo estas líneas



R₁ representa un hidrógeno, un radical alifático con máximo de 4 átomos de carbono, un radical ciclo-alifático de 6 átomos de carbono a lo sumo o un radical mono-cíclico aromático.

R₂ representa un hidrógeno o un radical alquilo inferior de 4 átomos de carbono.

Para la obtención de estos compuestos se hace reaccionar el ácido 6-amino-penicilánico, o una de sus sales, con un compuesto introductor de un ácido de fórmula general (II)



R₁ representa un hidrógeno, un radical alifático con máximo de 4 átomos de carbono, un radical ciclo-alifático de 6 átomos de carbono a lo sumo o un radical mono-cíclico aromático.

R₂ representa un hidrógeno o un radical alquilo inferior de 4 átomos de carbono.

Son adecuados como tales compuestos: haluros (preferentemente cloruros y bromuros); anhídridos y anhídridos mezclados en presencia de agentes fijadores de ácidos; los ácidos libres en presencia de fijadores de agua; azidas y esteres⁷¹⁵. El aislamiento de los productos de reacción en los medios orgánicos acuosos se puede realizar por acilación en frío y fijación del ácido 6-acil-amino-penicilánico, precipitado en un disolvente orgánico no miscible con agua; de éste puede extraerse el ácido con una solución acuosa de bicarbonato sódico o potásico. La solución acuosa de la sal sódica o potásica del ácido 6-acil-amino-penicilánico, se concentra in vacuo a bajas temperaturas y se liofiliza.

Para la obtención de sales con bases orgánicas se hacen reaccionar estas últimas con los ácidos libres en disolventes orgánicos, o bien las sales alcalinas de los ácidos se unen en agua con las sales de las bases orgánicas.

La preparación de los compuestos de la fórmula general (II), es decir, la preparación de ácidos alfa-(adamantano-1-il-tio) alcanóicos, se realiza mediante la reacción de la sal sódica de 1-adamantan-tiol con ésteres de ácido alfa-bromo-acéticos, con los radicales R₁ y R₂ adecuados, operando en un disolvente⁷¹⁶. El 1-adamantan-tiol, a su

⁷¹⁵ Según se describe en este procedimiento, son agentes fijadores de ácidos: bicarbonato sódico o potásico, hidróxido sódico o potásico en medio orgánico acuoso; bases terciarias o piridina en medio orgánico; como fijador de agua es útil la carbodi-imida-di-ciclo-hexílica; como anhídridos mezclados de ácidos de fórmula general (II) se pueden citar anhídridos con ácidos alcanóicos, especialmente ácido acético, así como también anhídridos con ésteres de ácido carbónico.

⁷¹⁶ El término R₁ alude a un hidrógeno; un radical alquílico inferior, como radical metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, butilo secundario o isobutilo; un radical alquénico, como el radical alilo, un radical ciclo-alquilo o ciclo-alquénico, como el radical ciclo-propilo, ciclo-butilo, ciclo-pentilo o ciclo-hexilo; un radical arilo o arilo sustituido, como el radical fenilo, p-tolilo, 3,4-dimetil-fenilo, m-fluoro-fenilo, p-fluoro-fenilo, m-cloro-fenilo, p-cloro-fenilo, p-bromo-fenilo, m-tri-fluoro-metil-fenilo, p-

vez, se puede obtener con 1-bromo-adamantan tratado con tío-urea y ácido bromhídrico, con hidrólisis del producto obtenido, bromuro de (1-adamantil)-iso-tío-urea, con lejía de sosa en solución acuoso-alcohólica.

Las sales de los ácidos obtenidos mediante este procedimiento son sales sódicas, potásicas, amónicas, magnésicas o cálcicas; o bien sales de base orgánica, como dietil-amina, trietil-amina, dietanol-amina, N-etil-dietanol-amina, pirrolidina, piperidina, N-etil-piperidina, morfolina, procaína, bencil-amina o dibencil-amina. Los autores, mediante una serie de ejemplos prácticos, explican su método para la preparación de estos derivados del ácido 6-amino-penicilánico⁷¹⁷.

2.2.7.j. Metil penicilinas

Con fecha 25 de mayo de 1961 la empresa danesa *Lovens Kemiske Fabrik ved a. Kongsted* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente destinado a

metoxi-fenilo, p-etoxi-fenilo, 3,4-dimetoxi-fenilo, 3,4-metileno-dioxi-fenilo o m-nitro-fenilo. El término R₂ alude a hidrógeno o a uno de los radicales alquilos inferiores mencionados.

⁷¹⁷ De entre los ejemplos expuestos en la memoria descriptiva reseñamos uno de ellos: 107 g. (0,5 moles) de 1-bromo-adamantan se hierven, a reflujo, durante 2-3 horas, con 76 g. (1 mol) de tío-urea y 250 cc. de ácido bromhídrico al 48% en 500 cc. de ácido acético glacial; sobre la mezcla caliente se vierten 1.800 g. de hielo; precipita el bromuro de (1-adamantil)-isourea, que se separa por succión, se lava con agua y, luego, con cloruro de metileno. Se agita a la temperatura ambiente, durante 14 horas, y se trata con 40 g. de hidróxido sódico en 1.000 partes de agua y 250 cc. de etanol. El producto de reacción se separa por succión y se disuelve en benceno. La solución bencénica se lava con agua y se concentra el 1-adamantan-tiol, que permanecía en forma de aceite, cristalizando al desleírlo con pentano.

Un total de 6 g. (0,15 moles) de amida sódica en toluol se deja fluir a una temperatura de baño de 150° C y en una atmósfera de nitrógeno, a una solución formada por 16,8 (0,1 moles) de 1-adamantan-tiol en 250 cc. de dimetil-éter de dietileno-glicol. La mezcla se hierve enérgicamente durante tres horas, bajo reflujo, luego se le añaden, gota a gota, en 30 minutos y a la misma temperatura, 34 g. de etil-éster del ácido alfa-bromo-acético; se hierve durante 14 horas; se enfría y se vierte sobre 1.000 g. de una mezcla de agua y hielo, y se extrae el toluol. La solución de toluol se lava varias veces con agua y luego se evapora el toluol. El etil-éster del ácido l-(adamanta-1-il-tío)-acético se purifica por destilación.

Para la obtención del ácido libre se hierve, durante 5 horas, a reflujo, el éster anteriormente obtenido como residuo de la evaporación, con 20 g. de hidróxido sódico en 400 cc. de etanol; el etanol se destila, el residuo se trata con 750 cc. de agua, y la fase acuosa se filtra; el filtrado se acila con ácido clorhídrico, el aceite precipitado se fija en benceno-éter; la solución se concentra, el residuo se disuelve en 1.000 cc. de lejía de sosa 0,2 N; la solución se clarifica con carbono y se filtra. Al acilar precipita el ácido alfa-(adamanta-1-il-tío)-acético.

Una cantidad de 1,05 g. de ácido alfa-(adamanta-1-il-tío)-acético y 0,7 cc. de trietil-amina se disuelven en 12 cc. de dioxanos y 10 cc. de acetona y se refrigeran a 0°-5° C; se le añade, en forma de gotas, 0,62 cc. de iso-butil-éster del ácido clorofórmico disuelto en 5 cc. de dioxanos. La mezcla se agita durante 15 minutos a 0° C y, luego, se filtra el clorhidrato de dietil-amina; al filtrado enfriado a 0° C se le adiciona una solución de 1,16 g. de ácido 6-amino-penicilánico al 86,1% en 10 cc. de agua y 1 cc. de trietil-amina. La solución se agita a la temperatura ambiente durante 60 minutos y se le adicionan 10 cc. de agua que contienen 1 g. de bicarbonato sódico, y todo se lava dos veces con 25 cc. de éter cada vez. La fase acuosa se deposita en capas con 20 cc. de metil-isobutil-cetona y se lleva a pH 2,1 con ácido sulfúrico 10 N. Al agitarla, transforma en la fase orgánica la mayor parte del producto de reacción en ácido libre; las capas se separan y la capa acuosa se extrae dos veces con 5 cc., cada vez, de metil-isobutil-cetona. Todos los extractos de metil-isobutil-cetona se unen, se lavan con 5 cc. de agua y se secan con sulfato sódico; se agita la solución de metil-isobutil-cetona con una solución al 3% de bicarbonato sódico, hasta que la fase orgánica ha alcanzado el pH de 6,8-7,0; se separan las fases y la fase orgánica se extrae de nuevo con 5 cc. de agua. Las partes acuosas combinadas se lavan con 25 cc. de éter disuelto en el evaporador rotatorio. La solución, limpia y casi incolora, obtenida de esta forma, de la sal sódica de (adamantan-1-il-tío)-metil-penicilina se concentra al vacío, a temperatura muy baja, o bien se liofiliza.

$$\begin{array}{ccccccc} & & & & \text{S} & \text{CH}_3 & \\ & & & & / & & \\ \text{R} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH} - \text{CH} & & & & \text{C} & & \\ | & | & & & / & & \\ \text{O} = \text{C} - \text{N} - \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2 & & & & \text{CH}_2 & & \end{array}$$

El método empleado en este procedimiento consiste en hacer reaccionar con amoniaco un anhídrido ácido mixto reactivo de la penicilina, que corresponde a la amida deseada, y otro ácido. El anhídrido ácido mixto puede ser un anhídrido de la penicilina y un ácido orgánico o inorgánico⁷¹⁹. La reacción del anhídrido mixto con amoniaco se produce añadiendo una solución del anhídrido a una solución alcalina en sal de amonio, precipitándose la amida según se va formando⁷²⁰.

Los autores indican, de forma práctica, cómo se puede producir metilpenicilinato de potasio por acilación del ácido 6-amino-penicilánico con anhídrido acético: se suspende 3,0 g. de ácido 6-amino-penicilánico en 10 ml. de agua; se agrega a la suspensión la cantidad equivalente de una solución acuosa al 25% de hidróxido de potasio; se enfría la solución con hielo-agua y se añaden 1,5 ml. de anhídrido de ácido acético, una sola vez, mientras se agita vigorosamente; la agitación se mantiene durante dos horas en un baño de hielo y se concentra la solución por evaporación, bajo presión reducida, a una temperatura de baño de 25° C hasta un volumen de 5 ml.; se agregan 10 ml. de n-butanol y se destila bajo presión reducida la mezcla azeotrópica n-butanol-agua. El metil-penicilinato de potasio cristaliza, se agregan 10 ml. de n-butanol al lodo

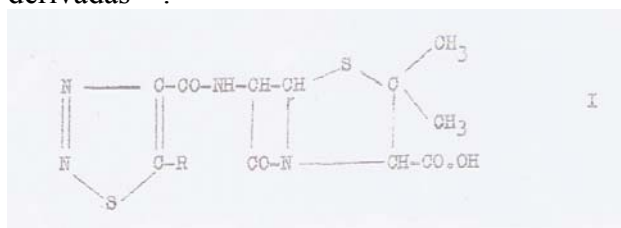
⁷¹⁹ Entre los ácidos orgánicos empleados en este procedimiento se encuentran: ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido trimetil-acético, ácido difenil-acético, ácido alfa-etil-hexanoico y ácido benzoico; los anhídridos ácidos mixtos de ácidos inorgánicos di- o polivalentes parcialmente esterificados, por ejemplo fosfito-dietílico, dan rendimientos satisfactorios; son particularmente apropiados los anhídridos mixtos de las penicilinas y los mono-ésteres de ácido carbónico. Para la producción de estos anhídridos, los autores remiten a la patente británica 727.481.

⁷²¹ Los autores reseñaron, en una tabla, la actividad del bencil-penicilinato de sodio y de otras amidas penicilínicas frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina y su estabilidad en presencia de penicilinas, preparada a partir de *Bacillus cereus*; fueron testadas: amida metil-penicilánica, amida etil-penicilánica, amida isopropil-penicilánica, amida isopropenil-penicilánica, bencil-penicilina (sal de sodio) y amida bencil-penicilánica.

cristalino que luego se filtra; se lava la torta de filtro, en dos ocasiones, con 2,5 ml. de n-butanol y luego con éter. El rendimiento es de 2,5 g.

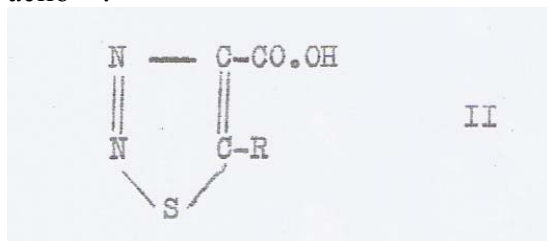
2.2.7.k. Tiadiazol-amino penicilinas

El 7 de diciembre de 1961, la empresa inglesa *May and Baker Limited* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente destinado a proteger un “Procedimiento de preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico y sus sales atóxicas”⁷²², especialmente destinados a ser eficaces contra las bacterias productoras de penicilinas. Los productos que se obtienen por este procedimiento responden a la fórmula general indicada bajo estas líneas, y a las sales atóxicas de ella derivadas⁷²³.



R representa un átomo de hidrógeno o un radical alcohilo, arilo, aralcohilo o cicloalcohilo.

Estos compuestos, de fórmula general I, pueden prepararse por reacción del ácido 6-amino-penicilánico, libre o en forma de sal neutra (como por ejemplo la sal de sodio), con un ácido tiazolil-4-carboxílico, de fórmula general II, o bien uno de sus derivados reactivos, que pueden reaccionar con un radical de amina para fijar en él un acilo⁷²⁴.



R representa un átomo de hidrógeno o un radical alcohilo, arilo, aralcohilo o cicloalcohilo.

La reacción con el ácido tiazolil-4-carboxílico se realiza en condiciones deshidratantes, con un disolvente orgánico que sea inerte respecto a los reactivos y productos de la reacción; el disolvente orgánico usado con preferencia es la dicitclohexil-carbodi-imida. Si se emplea como reactivo inicial un derivado reactivo del ácido, la reacción ha de realizarse a una temperatura inferior a 30° C y, con preferencia, entre 0° y 20° C. Es posible la reacción en medio acuoso orgánico o en un disolvente orgánico

⁷²² AHOEPM, patente 272.772; la memoria descriptiva consta de once páginas, escritas a máquina por una sola cara; como domicilio social de la entidad figura Dagenham (Essex, Inglaterra). El expediente se corresponde al aprobado, para esta misma firma, bajo patente británica 42.570/60, autorizada el 9-XII-1960. La solicitud española fue firmada el 7-XII-1961, la fecha de concesión es 2-I-1962 y la de publicación el 1-III-1962.

⁷²³ Entre las sales de estos compuestos se encuentran las sales metálicas, como las de sodio, potasio, calcio y aluminio; sales de amonio y de amonio sustituido, por ejemplo sales de aminas, tales como trietil-amina, procaína, dibencil-amina, N,N'-dibencil-etilén-diamina, N-alcohol-piperidinas y otras aminas conocidas por formar sales con las penicilinas.

⁷²⁴ Los derivados reactivos comprenden los cloruros, bromuros o anhídridos del ácido correspondiente, sus anhídridos mixtos con ácidos carboxílicos y sus ésteres, con preferencia los ésteres alifáticos inferiores.

inerte, tal como cloruro de metileno, dimetil-formamida, cloroformo, acetona, metil-isobutil-cetona o dioxanos⁷²⁵.

Se debe separar inmediatamente el producto de fórmula I de la mezcla de reacción, de acuerdo con las técnicas utilizadas para extraer las penicilinas; así se puede extraer por éter, metil o isobutil-cetona; se aísla por liofilización o bien en forma de sal insoluble en ese disolvente. También puede extraerse de una solución acuosa, por formación y aislamiento de una sal insoluble de una amina, la dibencil-amina. El producto separado, en forma de sal, puede llevarse a la forma de ácido libre, tratando la sal sódica o potásica por un ácido acuoso, como el sulfúrico. A partir del ácido libre pueden prepararse sales de aminas tipo procaina o N-etil-piperidina, por acción sobre la amina libre.

De los compuestos obtenidos por este procedimiento, cuando se usen en la terapéutica en forma de sales, solamente tienen utilidad aquellas cuyos cationes no tienen acciones secundarias desfavorables para el organismo; son sales adecuadas las de los metales alcalinos, de amonio y de amina. Los autores proponen una serie de ejemplos prácticos, con los que aportan más luz sobre su procedimiento⁷²⁶.

2.2.7.1. *Bencil-oxi penicilinas*

Con fecha de 19 de julio de 1963, la empresa francesa *Roussel-Uclaf* S.A. presenta, ante el registro español de patentes, una solicitud para proteger un "Procedimiento de preparación de un derivado de penicilina"⁷²⁷; una sal del ácido N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilánico, dotada de una notable actividad antibiótica⁷²⁸.

⁷²⁵ En medio acuoso, las condiciones fuertemente ácidas o alcalinas deben evitarse; conviene mantener el pH del medio de reacción entre 6 y 9, mediante el empleo de un moderador, tal como el bicarbonato sódico.

⁷²⁶ Dentro del conjunto de ejemplos ofertados por los autores, reseñamos el que consideramos más idóneo, en lo que respecta a ilustrar este procedimiento: a una suspensión de 2,16 g. de ácido 6-amino-pencilánico en 50 cc. de cloruro de metileno anhidro, se añade lentamente 2,76 cc. de trietil-amina; la temperatura de la mezcla se sitúa entre 0° y 5° C; a continuación se adiciona, gota a gota, una solución formada por 1,48 g. de cloruro de tiazol-1,2,3-oxi-carbonilo (obtenido por la reacción del cloruro de tionilo sobre el ácido correspondiente, según se indica en Charles D. HURD, Raymond I. MORI. "On acylhydrazones and 1,2,3-thiadiazoles". *Journal of the American Chemical Society*, 77(20): 5359-5364. Washington, DC, 1955), en 10 cc. de cloruro de metileno anhidro, manteniendo la temperatura indicada; se agita durante 1 a 2 horas a 0° C, se filtra y se evapora a la temperatura ambiente o por refrigeración. El residuo se extrae con agua fría y se trata el extracto con una solución acuosa fría de acetato de di-bencil-penicilina; precipita la sal insoluble de penicilina. Se lava por decantación con agua fría, se seca al vacío a 0° C, durante una noche, usando un secador de anhídrido fosfórico; a continuación se disuelve en cloruro de metileno anhidro y se añade una solución al 50% de 2-etil-hexanoato de potasio en butanol, se forma un precipitado de (tiadiazol-1,2,3-il-4carbonil)-amino-6-penicilinato de potasio. Se retira este precipitado, se lava con un poco de acetona anhidra y se seca al vacío a 0° C.

⁷²⁷ AHOEPM, patente 290.113; la memoria descriptiva, que consta de ocho hojas escritas a máquina, queda firmada, en Madrid, a 19 de julio de 1963; como domicilio social de la empresa figura el número 35 de Boulevard des Invalides, en París (Francia). El expediente se basa en los presentados en Francia, el 31-VIII-1962 (P.V. 908.340) y el 20-II-1963 (P.V. 925.432). La patente española fue concedida el 11-X-1963 y hecha pública el 1-XI-1963.

⁷²⁸ Los autores indican que, en ensayos *in vitro*, el nuevo producto ha sido hallado eficaz tanto contra cepas de estafilococos sensibles como resistentes a la eritromicina o a las penicilinas.

La nueva sal contiene un 43% de hexa-hidro-bencil-oxi-penicilina y un 69% de propionil-eritromicina, que desarrollan una actuación sinérgica, puesto que la concentraciones mínimas inhibitoras son inferiores a las de cada uno de los dos componentes activos tomados separadamente. Del mismo modo, la comparación efectuada sobre diversas cepas de estafilococos patógenos empleando bencil-penicilina (penicilina G) y 2,6-dimetoxi-fenil-penicilina (metecilina), esta última considerada entonces como la más activa frente a los estafilococos penicilino-resistentes productores de penicilinas, demuestra la superioridad de acción del N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilinato de propionil-eritromicina. Según los autores, la posología útil se encuentra entre 125-500 mg. por toma, y entre 500 y 2.500 mg. por día para adulto, en función de la vía de administración.

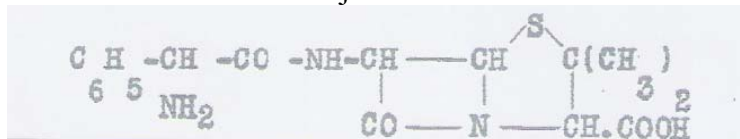
El procedimiento de preparación de esta sal es relativamente sencillo: se hace reaccionar, en medio hidro-acetónico, el ácido 6-amino-penicilánico, preferentemente en forma de sal de metal alcalino, con un halógeno-formiato de hexa-hidrobencilo, tal como el cloruro, se obtiene así el ácido N-(hexa-hidrobencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilánico, que se hace reaccionar, en forma de ácido libre o en forma de una de sus sales, en un disolvente miscible con agua, con propionil-eritromicina, o con una de sus sales, y se aísla después el producto buscado por precipitación en agua. El halógeno-formiato que no ha reaccionado se extrae por lavado de la mezcla de reacción con un disolvente inerte, como el éter; se enfría la fase acuosa, se añade un disolvente neutro, como metil-etil-cetona, se acidifica el conjunto a un pH 2 por medio de la adición de un ácido mineral, como el ácido sulfúrico acuoso, se separa la solución orgánica del producto en forma de ácido libre que se aísla en forma de la sal de una amina, como la N-etil-piperidina, se purifica esta sal por cristalización en un disolvente, tipo cetona o acetato de etilo, y se libera el ácido N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilánico por acidificación y, después, se hace reaccionar el ácido obtenido sobre propil-eritromicina en acetona; el producto formado se precipita con agua, se filtra, se escurre al vacío y se seca⁷²⁹.

⁷²⁹ Los autores facilitan un ejemplo práctico, dividido en tres etapas. Etapa 1: preparación de l N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilinato de N-etil-piperidina (compuesto A): se disuelve 1 g. de ácido 6-amino-penicilánico y 1,5 g. de bicarbonato de sodio en 30 cm³ de agua, se añaden 20 cm³ de acetona y, después, se adiciona, lentamente y agitando, una solución de 1 g. de cloro-formiato de hexa-hidro-bencilo en 10 cm³ de acetona; se mantiene la agitación durante, aproximadamente, 1 hora a la temperatura ambiente, se lava después varias veces con éter, se enfría la fase acuosa, se añaden 10 cm³ de metil-etil-cetona, se acidifica hasta pH 2 por adición de ácido sulfúrico 2 N, se separa la fase orgánica y se extrae de nuevo la fase acuosa, en varias veces, con metil-etil-cetona; seguidamente se reúnen los extractos, se lavan con agua helada, se añaden 0,5 cm³ de N-etil-piperidina a la solución del ácido N-(hexa-hidro-bencil-carbonil)-6-amino-penicilánico obtenido y se evapora al vacío; el producto se recoge en 10 cm³ de acetona a reflujo, se deja después que la solución obtenida cristalice por enfriamiento, se filtran con succión los cristales formados, se lavan con acetona helada y se secan al vacío; su punto de fusión es 138° C; el producto es muy soluble en agua, soluble en alcohol, en acetona y en cloroformo, e insoluble en éter y en benceno; el análisis ofrece unos porcentajes de O (58,9%), H (8,4%), N (8,6%) y S (7,0%), siendo los supuestos teóricos para C₂₃H₃₉O₅N₃S de O (58,82%), H (8,37%), N (8,94%) y S (6,84%). Este 'compuesto A', puede ser fácilmente transformado en la sal correspondiente, mediante doble descomposición con un bicarbonato de un metal alcalino, tal como sodio o potasio, empleado en cantidad estequiométrica; el N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilinato de potasio se presenta en forma de un compuesto sólido, incoloro, cristalizado en agujas, soluble en agua y en alcohol, e insoluble en éter, acetona, butanol anhidro y metil-etil-cetona; su punto de fusión determinado sobre un 'bloque de Maquenne' de calentamiento eléctrico es de 250° C (con descomposición).

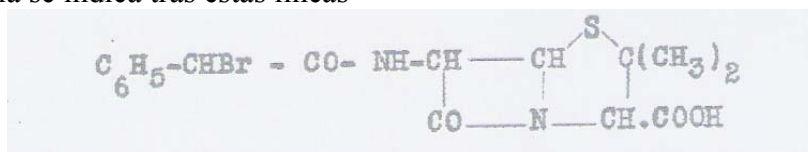
Etapa 2: preparación del ácido N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilánico: se disuelven 5,42 g. de N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilánico de N-etil-piperidina en 75 cm³ de agua, se añaden después 90 cm³ de cloruro de metileno, se enfría ligeramente y se acidifica hasta pH 2 por adición de ácido sulfúrico al 10%; se decanta la fase orgánica, se extrae la fase acuosa con

2.2.7.m. Amidas del ácido 6-APA

Con fecha 10 de agosto de 1963, la empresa española dirigida por José Robert Mestre presentó, ante el registro español de patentes, un "Procedimiento de fabricación de una amida del ácido 6-amino-penicilánico"⁷³⁰, mediante un sistema rápido y cómodo; su fórmula estructural se indica líneas abajo



El procedimiento consiste en hacer reaccionar, en primer lugar, el ácido 6-amino-penicilánico con bromuro de alfa-bromo-fenil-acetilo, formándose el compuesto cuya fórmula se indica tras estas líneas

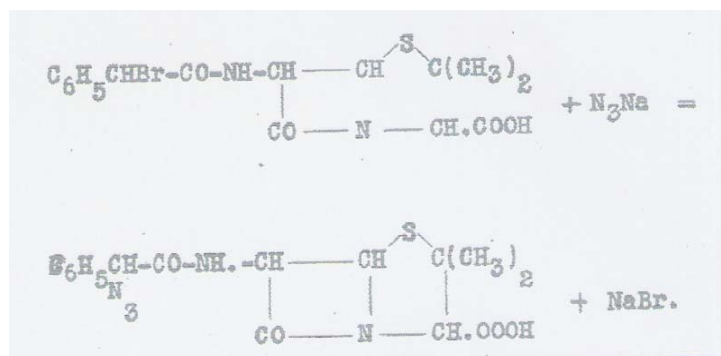


Para obtener este producto, según indica el autor, se ha de operar de la siguiente forma: el ácido 6-amino-penicilánico se disuelve en agua, en presencia de un pequeño exceso de bicarbonato sódico; la solución obtenida es diluida con acetona; esta solución diluida se enfría hasta 0° C; a continuación se le añade la correspondiente cantidad de bromuro de alfa-bromo-fenil-acetilo, disuelto en acetona seca; el proceso se hace gota a gota, manteniendo la temperatura a 0° C; la amida se forma al instante, quedando disuelta como sal sódica. Esta solución es lavada varias veces con éter; el extracto etéreo se elimina, pero la fase acuosa se acidifica con ácido sulfúrico 5 N hasta pH 2; la penicilina bromada es extraída con acetato de etilo. El extracto etéreo se lava con agua y se vuelve a preparar la penicilina sódica, añadiendo agua y agregando una solución de bicarbonato sódico al 4% hasta lograr un pH de 6,5 en la fase acuosa; la fase etérea es eliminada; la fase acuosa, que contiene la alfa-bromo-fenil-acetamido-penicilina, es valorada al objeto de conocer la cantidad de penicilina bromada presente. Una vez conocida la cantidad de penicilina, se procede a preparar con ella la correspondiente azida, agregando la equivalente cantidad de azida sódica disuelta en agua; se deja en reposo y se forma la azida del ácido fenil-acetamido-penicilánico, liberándose la cantidad equivalente de bromuro sódico. La reacción que ocurre queda reflejada en las líneas que siguen:

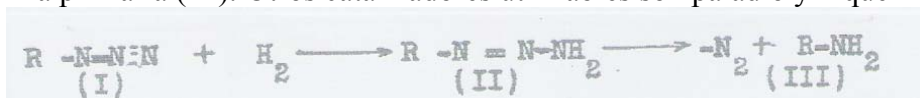
cloruro de metileno, se unen las fases orgánicas, se evaporan a vacío hasta sequedad y se obtienen 4,5 g. de ácido N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilánico.

Etapa 3. preparación del N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilinato de propionil-eritromicina: se disuelve el ácido N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilánico en 43 cm³ de acetona; se añaden, agitando, 9,075 g. de propionil eritromicina y, después, se introducen, gota a gota, 172 cm³ de agua, se ceba la cristalización y se deja en el frigorífico durante una noche; el producto obtenido se filtra con succión, se lava y seca. Se vuelve a cristalizar por disolución en acetona y precipitación con agua, se filtra con succión, se lava y seca, para recoger 9,1 g. de N-(hexa-hidro-bencil-oxi-carbonil)-6-amino-penicilinato de propionil-eritromicina, con un punto de fusión sobre 'bloque de Kofler' de 162° C, con descomposición. El producto es blanco, soluble en etanol y en metanol acuoso, en éter, acetona, benceno, cloroformo, y muy poco soluble en agua; el análisis ofrece unos porcentajes de O (59%), H (8,2%), N (3,7%) y S (2,8%), siendo los supuestos teóricos para C₅₆H₉₅O₁₉N₃S de O (58,66%), H (8,35%), N (3,66%) y S (2,79%); el peso molar es de 1.146,4.

⁷³⁰ AHOEPM, patente 291.104; la memoria descriptiva consta de ocho hojas foliadas y escritas a máquina, por una sola cara, como domicilio de José Robert Mestre, residente en Barcelona, figura el número 314 de la calle de Valencia. La memoria descriptiva queda firmada, en Madrid, el 10 de agosto de 1963; la patente fue concedida el 10 de septiembre de éste 1963 y publicada el 16 de septiembre de 1963.



Las azidas son muy sensibles a los agentes de reducción, son fácilmente hidrogenadas mediante el catalizador de Adams (óxido de platino reducido), en medio alcohólico o en solución de acetato de etilo y también en agua, cuando se trata de azidas hidrosolubles⁷³¹. La velocidad de la reacción es muy grande y la adición de hidrógeno es acompañada de un desprendimiento de nitrógeno, según el esquema indicado; el intermedio triazínico (II) no es estable en las condiciones experimentales, se transforma en la amina primaria (III). Otros catalizadores utilizables son paladio y níquel Raney⁷³².



El autor, teniendo en cuenta estas referencias bibliográficas, procedió a reducir temporalmente la azida en disolución acuosa, empleando como catalizador el óxido de paladio reducido, operando a la temperatura ambiente y a una presión de 50-60 atmósferas de hidrógeno; con ello consiguió, al cabo de una hora y media, la transformación completa. Filtró el catalizador y procedió a acidificar, con ácido sulfúrico diluido, hasta un pH 2. La nueva penicilina fue extraída con éter, obteniendo a partir de ella la sal sódica, con una solución diluida de hidróxido sódico hasta un pH 7. Al evaporar a baja temperatura se obtiene alfa-amino-bencil-penicilina racémica, que puede volver a ser cristalizada de una solución de agua y acetona⁷³³. Para completar su memoria, el autor plantea un caso práctico⁷³⁴.

⁷³¹ El autor utiliza como referencia los trabajos de Alfred BERTHO, Joseph MAIER "Die katalytische Hydrierung von Aziden". *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 498: 50-61. Berlín, 1932; P. A. LEVENE, Alexandre ROTHEN, Martin KUNA. "Optical rotations of configurationally related azides". *Journal of Biological Chemistry*, 115: 401-413. Baltimore, 1936.

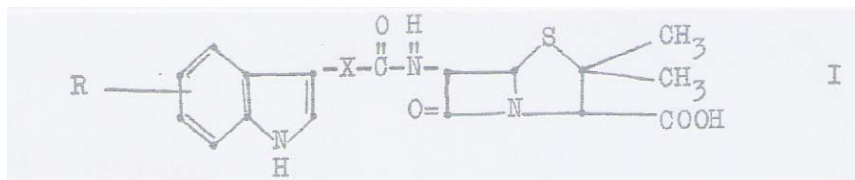
⁷³² En la memoria descriptiva se señala que los estudios de P. A. LEVENE, Alexandre ROTHEN, Martin KUNA ("Optical rotations of configurationally related azides". *Journal of Biological Chemistry*, 115: 401-413. Baltimore, 1936), permitieron preparar, a partir de las correspondientes azidas dextrógira y levógira, aminas que conservaron las mismas propiedades rotatorias.

⁷³³ Operando de esta forma se pueden obtener dos penicilinas ópticamente activas. Conviene partir del ácido alfa-bromo-fenil-acético dextro (o levo) y obtener alfa-bromo-bencil-penicilina (o levo) con la 'técnica de Boissonas', que consiste en hacer reaccionar el ácido d-alfa-bromo-fenil-acético con una sal de cloro-formiato de etilo o de isobutilo, a una temperatura de -5° C; esta mezcla reacciona, luego, con una solución acuosa de ácido 6-amino-penicilánico disuelto bajo forma de sal de trietil-amina; se pasa a continuación a la correspondiente azida y amina, según el procedimiento que se ha descrito para el derivado racémico.

⁷³⁴ Es el siguiente: 21,6 g. de ácido 6-amino-penicilánico se suspenden en 300 cc. de agua destilada; a esta suspensión se le agregan 20 g. de bicarbonato sódico, se diluye con 200 cc. de acetona; se enfría a 0° C y se añaden, con agitación, 30 g. de bromuro de alfa-bromo-fenil-acetilo disueltos en 50 cc. de acetona anhidra; se extrae dos veces la solución con 3.000 cc. de éter, enfriando a 0° C y con adición de ácido sulfúrico 5 N hasta conseguir un pH de 2; se extrae alfa-bromo-fenil-acetamido-penicilina con 200 cc. de acetato de etilo; el extracto etéreo, separado de la parte acuosa, se lava con agua, se le interponen 50 cc. de agua y se le añade una solución de bicarbonato sódico hasta alcanzar un pH de 6,6 en

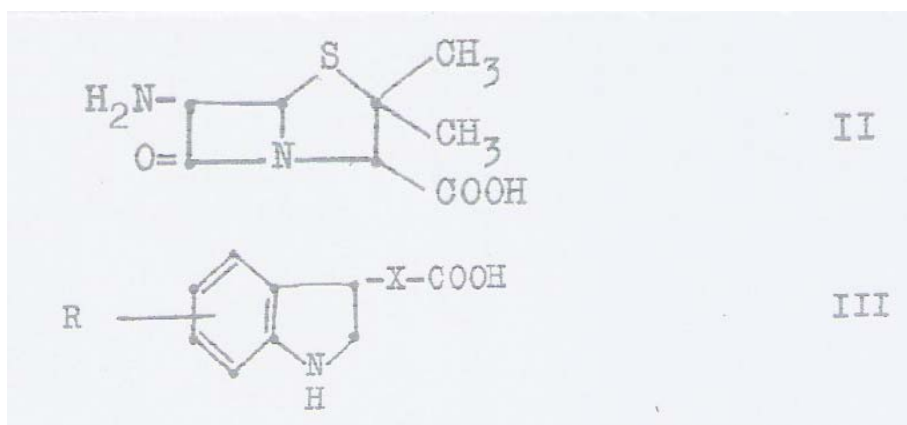
2.2.7.n. Indoil penicilinas

Con fecha 26 de octubre de 1963, la empresa alemana del *Dr. Karl Thomae* G.M.B.H., presentó ante el registro español una patente de invención destinada a proteger un “Procedimiento para la obtención de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico”⁷³⁵, referido a productos de fórmula general como la indicada bajo estas líneas:



R representa un átomo de hidrógeno o un resto inferior de alquilo o de alcóxido. / X representa los restos siguientes: O=C-, -CH=CH-, O=C-[R']-H, -(CH₂)_n, siendo R' un resto inferior de alquilo, el valor de n oscila de 0 hasta 3.

Los nuevos compuestos son obtenidos realizando la transformación del ácido 6-amino-penicilánico [fórmula II], mediante un halogenuro, anhídrido o anhídrido mixto de un ácido [fórmula III] (los significados de R y de X son los ya señalados en la fórmula general [fórmula I]).



Los autores señalan que han dado buenos resultados la transformación del ácido 6-amino-penicilánico con un cloruro ácido de un ácido [fórmula III]; un anhídrido mixto

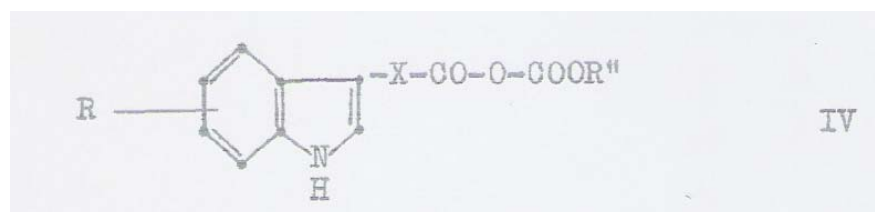
la fase acuosa; se separa la parte etérea y, en la fase acuosa que contiene la penicilina bromada, se determina la cantidad de penicilina disponible: rendimiento sobre el 73% de la cantidad teórica calculada sobre el ácido 6-amino-penicilánico de partida. Se agrega entonces una solución acuosa que contenga la cantidad equivalente de azida sódica y se deja en reposo; se agrega 1 g. de óxido de platino y se reduce con hidrógeno, a una presión de 40-50 atmósferas a temperatura ambiente; una vez terminada la reducción se recupera el catalizador por filtración y se acidifica con ácido sulfúrico 5 N; se extrae dos veces con 250 cc. de éter. Los extractos etéreos se reúnen y, desde la solución etérea, se pasa otra vez a preparar la sal sódica de alfa-amino-bencil-penicilina, con una solución al 1% de hidróxido sódico, hasta alcanzar un pH 7 en la fase acuosa; se separa la parte etérea, y la fase acuosa se concentra a pequeño volumen y baja temperatura; cristaliza alfa-amino-bencil-penicilina de una mezcla de acetona y agua, con un rendimiento del 30% sobre el ácido 6-amino-penicilánico de partida.

⁷³⁵ AHOEPM, patente 292.923; la memoria descriptiva consta de nueve hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras; como domicilio social de la empresa se hace constar: Riberach an der Riss (República Federal Alemana). La patente fue presentada, en España, con fecha de 26 de octubre de 1963; se concedió el 24 de enero de 1964 y fue hecha pública el 1-II-1964. El expediente se acoge a una patente con prioridad alemana: 22.943/62, de fecha 31 de octubre de 1962.

constituido por un ácido del tipo de la fórmula [III] y un éster de ácido clorofórmico, de fórmula Cl-COO-R'' , donde R'' representa un resto alquílico inferior.

1º) Transformación del ácido 6-amino-penicilánico con un cloruro ácido de un ácido de la fórmula general (III). La reacción se ha de realizar en un disolvente, en presencia de ácido clorhídrico, normalmente a la temperatura ambiente; por cada mol de ácido 6-amino-penicilánico, se emplean de 1,1 a 1,3 moles de cloruro ácido; como fijador del ácido clorhídrico pueden utilizarse carbonatos y bicarbonatos alcalinos, o bien bases orgánicas terciarias, como por ejemplo la trietil-amina. El cloruro de ácido se disuelve en disolvente orgánico inerte y, su solución, se va añadiendo a gotas, con enfriamiento, a una solución acuosa, o con disolvente orgánico, de ácido 6-amino-penicilánico y del fijador del ácido clorhídrico. La solución se regula a un pH 2-3 y se extrae el compuesto que se ha formado [fórmula I] mediante un disolvente orgánico no miscible con agua, como por ejemplo éter, benzol o cloroformo. Con posterioridad, se seca la solución y, mediante una evaporación suave del disolvente, se puede obtener el ácido libre.

2º) Transformación del ácido 6-amino-penicilánico con un anhídrido mixto de fórmula general IV, en el cual R , X y R'' tienen los significados indicados líneas arriba⁷³⁶.



La reacción se realiza en presencia de un disolvente y de un catalizador básico, como puede ser una base orgánica terciaria, por ejemplo trietil-amina; el proceso se comienza con enfriamiento y se concluye a la temperatura ambiente; por un mol de ácido 6-amino-penicilánico se emplea un exceso de anhídrido mixto; como disolventes se utilizan disolventes orgánicos inertes, tales como los hidrocarburos halogenados, acetona, dioxanos y similares. El ácido 6-amino-penicilánico, así como el catalizador básico usado, pueden ser disueltos en agua. Terminada la reacción, se evapora el disolvente empleado, se regula el residuo con ácido diluido para mantenerlo a un pH de 2 a 3, y se extrae el compuesto de fórmula I. También aquí se puede secar la solución y obtener de ella el ácido libre, al evaporar el disolvente.

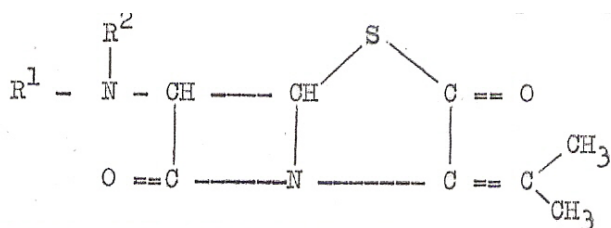
Para el empleo terapéutico, se utilizan las sales estables de ácidos de fórmula I con bases inorgánicas u orgánicas fisiológicamente tolerables, por ejemplo sales alcalinas o sus sales con bases orgánicas, especialmente con diciclo-hexil-amina y procaína. La obtención de las sales se realiza de la siguiente manera: se disuelven los ácidos en un disolvente orgánico seco, o bien se emplean las soluciones secas; se adicionan estas soluciones a una cantidad equimolar de la base correspondiente en un disolvente orgánico inerte, precipitándose la sal deseada; alternatively, se puede agitar la solución de la base hasta alcanzar un valor de pH de 6,5 y se concentra la solución acuosa de la sal formada en el vacío. Las sales alcalinas pueden también obtenerse por transformación de una solución de ácido de fórmula I, con una solución

⁷³⁶ El anhídrido mixto de la fórmula IV es obtenido por transformación de un ácido de fórmula III, con un éster de ácido cloro-carbónico de formula general Cl-CO-O-R'' , en un disolvente inerte, en presencia de un fijador de hidrácido; como tal se emplea una base terciaria.

concentrada de una sal alcalina del ácido alfa-etil-caprónico, precipitando la sal alcalina deseada. El autor propone un par de ejemplos prácticos⁷³⁷,

2.2.8. Anhidropenicilinas

El 16 de agosto de 1962 la empresa de nacionalidad norteamericana *Bristol-Myers Company* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para solicitar la protección de un “Procedimiento de fabricación de una anhidropenicilina”⁷³⁸, diseñado por el canadiense Saul Wolfe. Este procedimiento está relacionado con la preparación de nuevos derivados de compuestos penicilínicos de fórmula general



R¹ y R² pueden ser hidrógeno, alquilo, aralquilo, acilo, carbamilo, aril-sulfonilo, alquil-sulfonilo y, considerados conjuntamente, un radical de una base de Schiff o el grupo N-ftaloilo; de preferencia, R¹ es acilo y R² es hidrógeno.

Estas anhidro-penicilinas se convierten en compuestos con el núcleo de la cefalosporina C, siendo así productos intermedios de investigación para nuevos tipos de compuestos. Estos nuevos productos se preparan haciendo reaccionar un agente básico con un derivado penicilínico seleccionado del grupo de los haluros de ácidos de penicilina y anhídros penicilínicos mezclados; este agente básico puede ser una amina terciaria o un alcóxido metálico alcalino.

El método comprende el proceso de reacción de una amina terciaria con un anhídrido penicilínico mezclado o un haluro penicilínico. También puede realizarse mediante la reacción de un alcóxido metálico alcalino con un anhídrido penicilínico mezclado.

Si el procedimiento se lleva a cabo empleando un haluro ácido penicilínico, el material inicial puede prepararse mediante procedimientos conocidos; por ejemplo, la

⁷³⁷ Sal de díciclo-hexil-amina de la indolil-3-carbonil-penicilina: se disuelven en solución acuosa de bicarbonato sódico 432 mg. (0,002 moles) de ácido 6-amino-penicilánico; se le añaden 414 mg. (0,002 moles) de cloruro de ácido indolil-3-glioxílico, disueltos en acetona; a continuación se le adiciona ácido sulfúrico 5 N hasta alcanzar un pH 2; se extrae tres veces, cada una con 30 ml. de éter; los extractos etéreos reunidos son lavados con agua, secados con sulfato sódico y, a la solución filtrada, se le añaden 362 mg. (0,002 moles) de díciclo-hexil-amina; el aceite que se separa se seca sobre KOH, en vacío.

Sal de procaína de indolil-3-trimetilén-penicilina: se disuelven en 40 ml. de dioxanos:acetona (1:1), 812 mg. (0,04 moles) de ácido indolil-3-butírico y 400 mg. de trietil-amina, se agitan a 0° C y se adicionan 430 mg. (0,004 moles) de etil-éster de ácido clorofórmico; se añade, a gotas, una solución acuosa de 430 mg. (0,002 moles) de ácido 6-amino-penicilánico y 50 mg. de trietil-amina y se remueve durante una hora; la preparación se realiza de la manera descrita en el caso anterior; a continuación se adiciona la solución etérica seca del ácido, con una solución de 948 mg. (0,004 moles) de la base de procaína; el aceite que se separa se seca sobre KOH, en el vacío.

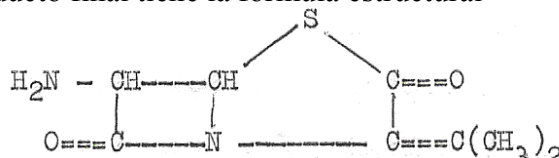
⁷³⁸ AHOEPM, patente 280.079; la memoria descriptiva consta de 20 páginas, escritas a máquina, firmadas en Madrid, a 16 de agosto de 1962. Esta solicitud se corresponde con la patente estadounidense 131.719 de 16-VIII-1961. La empresa figura como establecida en Thompson Road, East Syracuse (Nueva York. EE .UU.). La patente española fue concedida el 25-III-1963 y publicada el 1-VI-1963.

reacción de una penicilina con un haluro de tionilo, tal como el cloruro de tionilo, producirá el correspondiente haluro ácido penicilínico. Análogamente, si el procedimiento se realiza usando un anhídrido penicilínico mezclado, el material inicial puede prepararse por los procedimientos conocidos de preparación de anhídridos mezclados de ácidos carboxílicos. Los procedimientos citados implican el tratamiento del ácido con suficiente base, tal como trietil-amina, para formar la sal y el tratamiento de ésta con un reactivo del tipo del cloro-carbonato alquílico o un cloruro organo-sulfonilo para formar el anhídrido mezclado.

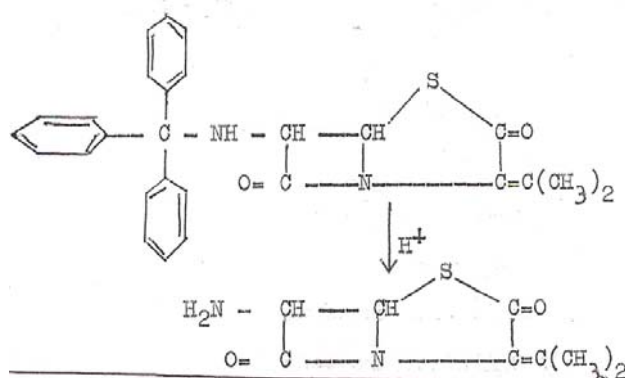
Otro de los procedimientos registrado por esta patente se caracteriza por la reacción de un haluro ácido penicilínico con un agente básico, tal como una amida terciaria, preferiblemente trietil-amina. Esta reacción se lleva cabo en un disolvente no reactivo, tal como el cloruro de metileno. Aunque la temperatura de reacción no es crítica, es preferible realizarla entre -40°C y la temperatura ambiente (25°C). Igualmente, las proporciones de los reactivos tampoco son críticas, pero es aconsejable usar un exceso de amina terciaria para asegurar que la reacción se completa y se obtienen unos rendimientos óptimos; generalmente se emplean de uno a tres moles de amina terciaria por cada mol de haluro ácido penicilínico. Una vez completada la reacción, puede retirarse el disolvente y recristalizarse el producto a partir de etanol o un mezcla de acetona y agua para obtener anhidro-penicilina pura.

En otra versión de este procedimiento, la reacción ocurre entre un anhídrido mezclado de la penicilina con una amina terciaria, preferiblemente trietil-amina, o un alcóxido metálico alcalino, metóxido sódico por elección; conviene que la reacción se lleve acabo en presencia de un disolvente como el cloruro de metileno. La temperatura a que se efectúa puede variar entre -40°C y la temperatura de reflujo de la solución. Las proporciones de los reactivos también varían, aunque parece preferible emplear, de media, dos moles de amina terciaria o alcóxido metálico alcalino por mol de anhídrido penicilínico mezclado. Al completarse la reacción, puede recuperarse anhidro-penicilina pura por eliminación del disolvente y nueva cristalización del producto.

En otra versión, el compuesto penicilínico inicial es el ácido 6-amino-penicilánico y el producto final tiene la fórmula estructural



a la que el autor denomina ácido anhidro-6-amino-penicilánico. Como puede observarse, el producto final difiere empíricamente de la penicilina inicial en la pérdida de H_2O , por ello se le designa por anhidro-penicilina. El ácido anhidro-tritil-6-amino-penicilánico es particularmente útil para la preparación del propio núcleo de la anhidro-penicilina, tratado con un ligero exceso de cloruro de hidrógeno anhidro en éter-dioxano, de acuerdo con la reacción indicada:



Además de su empleo como productos intermedios en la preparación de compuestos biológicamente activos, los productos de esta serie han resultado ser, también, relajadores musculares⁷³⁹. Los autores exponen una docena de ejemplos que ilustran los métodos de puesta en práctica de esta invención⁷⁴⁰.

2.2.9. Penicilinasas

Las propiedades bacteriostáticas de la penicilina son destruidas por el enzima penicilinasas, que es un metabolito extracelular producido por varias especies de bacterias gram-negativas y ciertas especies gram-positivas, como los bacilos coniformes o los bacilos aerobios esporógenos, entre otros. Hasta finales de la década de 1950, las preparaciones de penicilinasas desempeñaron un papel importante en la fabricación comercial de penicilina, empleándose en el ensayo de su esterilidad y en la

⁷³⁹ Los autores mencionan que una dosis intraperitoneal de 1.000 mcg. de anhidro-alfa-fenoxi-etil-penicilina por kg. de peso del organismo receptor, ejerció en éste una relajación muscular generalizada; no se produjo ningún efecto estimulante o depresivo del sistema nervioso central ni afectó adversamente al tiempo de coagulación sanguínea.

⁷⁴⁰ El primero de ellos ilustra la producción de anhidro-alfa-fenoxi-etil-penicilina mediante el cloruro ácido de alfa-fenoxi-etil-penicilina: se agitó, durante 1 hora, a la temperatura ambiente (25° C), una mezcla de 100,0 g. (0,25 moles) de alfa-fenoxi-etil-penicilina potásica, 35 g. (0,25 moles) de hidrócloruro de trietil-amina y 1 l. de cloruro de metileno. Se añadieron 20 ml. (0,25 moles) de piridina y se enfrió la solución a -30° C. A continuación se agregaron 24,5 ml. (0,30 moles) de cloruro de tionilo con agitación rápida y luego, durante 1 hora, se agitó la mezcla a temperatura de -25° a -30° C. A la solución resultante, de color naranja brillante, se añadieron 70,0 ml. (0,50 moles) de trietil-amina. Se agitó la mezcla durante 10 minutos a -30° C, se calentó rápidamente a la temperatura ambiente y se templó con 30 ml. de ácido acético glacial. Se lavó la solución con dos porciones de 150 ml. de agua y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Se filtró en cuatro litros de éter anhidro, se trató con carbón vegetal y se filtró de nuevo. El disolvente fue retirado del filtrado dejando una goma oscura; este residuo fue disuelto en 100 ml. de etanol absoluto y se enfrió la solución para dar 20,4 g. de cristales amarillos. Esto supuso una producción del 23% del producto crudo. Los cristales amarillos fueron nuevamente cristalizados a partir de etanol hirviente, conteniendo carbón vegetal, para dar 18,8 g. de producto puro, con un punto de fusión de 148° a 150° C; esto representó un rendimiento del 21,7%. El producto final, anhidrido-alfa-fenoxi-etil-penicilina, respondía al análisis porcentual calculado para: $C_{17}H_{18}N_2O_4S$: C (59,0%), H (5,21%), N (8,10%) y S (9,25%); lo observado fue C (59,16%), H (5,25%), N (8,31%) y S (8,56%). Se recuperó inalterada y cuantitativamente anhidro-alfa-fenoxi-etil-penicilina después de la irradiación de una solución en benceno conteniendo un vestigio de yodo a 65° C con lámpara 'photoflood' durante 12 horas, o con un arco de mercurio 'Hanovia' de 100 vatios durante 30 minutos y después de refluir una mezcla con un 5% de paladio sobre carbón vegetal en dioxano durante 18 horas, en tolueno durante 2 horas o xileno durante toda la noche. La anhidro-alfa-fenoxi-etil-penicilina exhibe una fuerte absorción de beta-lactama y amida-carbonilo en el espectro infrarrojo y muy poca actividad antimicrobiana; además, el espectro infrarrojo muestra fuertes bandas a 5,95 micras ($C=O$) y 6,1 micras ($C=C$); la estructura anteriormente indicada ha sido confirmada, señalan los autores, por análisis de espectro de resonancia magnética nuclear.

determinación de los recuentos microbiales sobre productos que contienen penicilina. También se utilizó en medios para cultivos de organismos a partir de sangre y otros líquidos del cuerpo que contienen penicilina, para determinar la concentración de penicilina en dichos líquidos.

Aunque estos usos corrientes de la penicilinasas, con la posible excepción del ensayo químico que se basa en la transformación de penicilina en ácido penicilánico, requieren un producto relativamente estéril, la producción comercial de penicilinasas representaba, generalmente, una solución intermedia entre lo práctico y lo conveniente, en el sentido de que las técnicas de esterilización ordinarias causaban una destrucción parcial de la actividad de ese enzima extraordinariamente lábil; es posible que un 95% de la potencia se pierda al calentar la penicilinasas, durante una hora, a 45° C.

Desde 1956, la penicilinasas posee, además, valor terapéutico en el tratamiento de la hipersensibilidad alérgica; cuando el enzima es administrado por inyección parenteral da como resultado la destrucción rápida de toda la penicilina circulante, con el alivio de las molestias que acompañan a las reacciones de sensibilidad que presentaban las penicilinas de reserva de acción prolongada, que en aquel entonces se empleaban⁷⁴¹.

2.2.9.a. Penicilinasas exentas de pirógenos

El 7 de mayo de 1958 la empresa norteamericana *Schenley Industries Inc.* presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, “Un procedimiento para la producción de penicilinasas exentas de pirógenos”⁷⁴². El objeto principal de esta invención, según señalan los autores de la memoria, es desarrollar un procedimiento que dé origen a productos de gran potencia, adecuados para la terapia de inyección en animales de sangre caliente, así como de las técnicas de cultivo y ensayo. Otro objeto es obtener nuevas composiciones que sean útiles para combatir reacciones molestas de la penicilina, que contienen como ingrediente activo penicilinasas libres de pirógenos.

Según este procedimiento, se inocula en una vasija de siembra, con un medio nutritivo estéril, un microorganismo formador de penicilinasas⁷⁴³; se debe incubar durante un período de tiempo entre 18-24 horas a 30° C, con o sin aireación. Después de la incubación del microorganismo, la siembra se traslada, bajo condiciones estériles, a una vasija de fermentación que contiene el medio nutritivo estéril, se airea y se incuba durante un período adicional de 44-52 horas, a 25°-26° C. La producción de penicilinasas se puede estimular biosintéticamente por adición de sales estériles de penicilina, a

⁷⁴¹ Así lo indican Robert M. BECKER. Jack BOGLE. “Effect of penicillinase on circulating penicillin”. *The New England Journal of Medicine*, 254: 952-953. Boston, 1956. (Cf. AHOEPM, patente 241.768)

⁷⁴² AHOEPM, patente 241.768; la memoria descriptiva consta de catorce hojas escritas a máquina por una sola de sus caras, queda firmada en Madrid, a 7 de mayo de 1958. El expediente se corresponde con el presentado ante la Administración de los Estados Unidos de América el 28 de mayo de 1957, bajo el número de registro 662.000/57. La entidad figura como establecida en 350 Fifth Avenue, Nueva York (Nueva York. EE.UU.). La patente española fue concedida el 30-V-1958 y hecha pública el 16-XI-1958.

⁷⁴³ Se puede emplear cualquiera de los microorganismos habituales: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, que producen el enzima deseado a una velocidad satisfactoria para la mayoría de los fines, pero se prefiere emplear *Bacillus cereus* cepa NRRL-B569 para la producción industrial, pues presenta un elevado rendimiento en la obtención del enzima, cuando se cultiva este microorganismo en el medio específico de este procedimiento.

intervalos determinados, durante el ciclo de fermentación. Terminado el ciclo de fermentación, el medio se clarifica por centrifugación al separar así los sólidos que pueda contener. El centrifugado obtenido se mezcla, aproximadamente, con dos volúmenes de acetona, con agitación, a una temperatura de 5° C. Después de un período de mezclado de una hora, la mezcla se deja sedimentar durante 8-16 horas; el líquido que sobrenada se decanta y la mezcla resultante de sólidos-líquido se filtra por cualquier método adecuado, como podría ser un paño filtrante de vidrio tejido. La masa que resulta se lava con una solución fría, a 5° C, formada de dos partes de acetona y una parte de agua. A continuación se ponen los sólidos en suspensión, en un volumen de agua fría exenta de pirógenos equivalente a 1/10 a 1/15 del volumen del medio de fermentación. La mezcla resultante se somete a una evaporación en vacío (5-10 mm. de mercurio) hasta eliminar por completo la acetona; esto ocurre alrededor de unas tres horas, y la suspensión se agita después a 5° C hasta disolver completamente la penicilinas. Los sólidos se separan por cualquier técnica de filtración apropiada. El precipitado obtenido se lava con 1/3 de volumen de agua fría exenta de pirógenos, a 1°-3° C. El filtrado y los líquidos de lavado se unen.

El filtrado y los líquidos de lavado reunidos se tratan luego con cantidades de sulfato amónico exactamente controladas para efectuar la precipitación fraccionada de material inerte indeseable, sin pérdida apreciable de los valores enzimáticos presentes. A los líquidos de lavado y filtrado reunidos, agitados, se añaden 100-200 g. de sulfato amónico por litro de solución. La mezcla se deja en reposo durante 8-16 horas a una temperatura comprendida entre los límites de 5°-10° C y el precipitado resultante se filtra, preferiblemente a través de un filtro de vidrio de porosidad media. El filtrado se trata con cantidades adicionales de sulfato amónico para lograr la formación de un precipitado que contiene penicilinas; para realizar esta operación, se añaden 400-550 g. de sulfato amónico por litro de solución, agitando sobre el filtrado. La mezcla resultante se deja en reposo a una temperatura entre 5°-10° C durante 8-16 horas; los sólidos se separan del líquido por centrifugación o filtración y los sólidos recuperados se disuelven, después, en un volumen de agua exenta de pirógeno para dar una concentración de penicilinas de 1.500.000-2.000.000 unidades por mililitro de solución⁷⁴⁴. Si se desea, al llegar este punto puede repetirse el tratamiento con sulfato amónico para precipitar la penicilinas y las operaciones subsiguientes, que acaban de exponerse, con ánimo de lograr una mayor purificación del producto.

Al objeto de separar de la penicilinas obtenida el sulfato amónico que le acompaña se debe dializar. Para conseguir el fin propuesto, se traslada la solución concentrada al tubo dializador de celofán y se deja dializar contra una solución de agua fría exenta de pirógeno con cloruro sódico, que circulará durante 24 horas. La solución de cloruro sódico es de concentración tal que el producto seco resultante de penicilinas es isotónico cuando se disuelve en un volumen determinado de agua. Por último, la solución dializada de penicilinas se filtra, en condiciones estériles, a través de un filtro de vidrio muy fino o de una bujía de filtración cerámica 'Selas'.

La solución estéril se introduce, asépticamente, en viales y se seca por evaporación en vacío o por liofilización. Los viales se cierran luego en condiciones estériles y se tapan de manera ordinaria⁷⁴⁵.

⁷⁴⁴ Una unidad de penicilinas es la cantidad que efectúa la inactividad de 10 moles de penicilina (59,3 U.O. de bencil-penicilina sódica por hora, a 25°C y pH 7.0) *vide* Gabor B. LEVY. "A unit of penicillinase". *Nature*, 166: 740-741. Londres, 1950.

⁷⁴⁵ Los autores proponen un ejemplo para facilitar la interpretación de su procedimiento.

a) Preparación de tubos inclinados de inoculación de *Bacillus cereus*: el medio propuesto tiene la siguiente composición: extracto de levadura (5,0 g./l.), agar (20,0 g./l.) y solución tampón de fosfato (1 l.). La mezcla resultante se calienta suavemente hasta que funde el agar, luego se distribuye en lotes de 20 ml. en tubos de ensayo y se esteriliza durante 20 minutos a 121° C; después de la esterilización, mientras los tubos están aún calientes y el contenido en forma líquida, se voltean los tubos para formar las placas inclinadas; se dejan enfriar a temperatura ambiente. A continuación, los cultivos inclinados se inoculan con un bucle de *Bacillus cereus* (cepa NRRL-B569) y se incuban durante 18-24 horas a 30° C. La solución tampón de fosfato empleada se prepara disolviendo 6,77 g. de KH_2PO_4 por litro de agua para formar una solución 0,05 M de fosfato potásico monobásico y disolviendo 13,4 g. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro de agua para formar una solución 0,05 M de fosfato sódico di-básico; la solución de fosfato sódico di-básico se agrega luego a la solución de fosfato potásico monobásico hasta que el pH de la mezcla alcanza 7,0.

b) Preparación de los matraces de *inoculum*: se prepara un medio con la siguiente composición: extracto de levadura (5,0 g./l.), solución tampón de fosfato (conformada como se indica líneas arriba) hasta un litro. Este medio se distribuye en matraces Erlenmeyer de 500 ml. (cantidad contenida en cada matraz 180 ml.); los matraces se esterilizan durante 20 minutos a 12° C; el medio se inocula después con 1,0 ml. de una suspensión densa de cultivos inclinados inoculantes de *Bacillus cereus* (A) y se incuban durante 18-24 horas a 30° C. Por otro lado, se preparó un medio de fermentación con la siguiente composición: líquido de maceración de maíz (10,0 g./l.), extracto de levadura (5,0 g./l.), solución tampón de fosfato (II) hasta 1 litro, aceite de manteca de cerdo (1,0 ml./l.); la solución tampón de fosfato (II) se prepara disolviendo 7,43 g. de KH_2PO_4 y 36,60 g. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua; esta solución tiene que encontrarse entre los valores de pH 6,95 y 7,05; si el pH sale de los límites indicados, se debe ajustar con adiciones de NaOH o de H_3PO_4 , según sea necesario. De este medio de fermentación se preparan 10 litros; se introducen en un recipiente Pirex de 10 l. de capacidad, el recipiente de fermentación está provisto de un tapón de caucho con accesorios adecuados para la tubería de entrada de aire estéril. El recipiente, sus accesorios y el contenido se esterilizan durante una hora a una temperatura de 12° C y, después, a 25°-27° C. El contenido total de un matraz de *inoculum* Erlenmeyer de 500 ml. (preparado por el procedimiento b) se traslada asépticamente al fermentador de la garrafa. Se conecta luego el dispositivo de entrada de aire y se establece un flujo de corriente de aire estéril de 7,36 l./minuto, lo que equivale a 1 litro de aire por litro del medio por minuto. Durante el ciclo de fermentación se ha de mantener todo el medio a una temperatura de 25°-26° C. Se pueden hacer adiciones de solución de penicilina potásica estéril al medio de fermentación durante el período del ciclo de 3 a 10 horas, teniendo en cuenta que la adición total no debe exceder de 35 unidades por mililitro; en este caso se realizaron cuatro adiciones estériles de solución de penicilina potásica: a las 3 horas, 7.000 U.O.; a las 5 horas, 21.000 U.O.; a las 6,5 horas, 42.000 U.O. y a las 8 horas, 105.000 U.O.; en total 175.000 U.O. [25 U.O./ml.]. La solución de penicilina fue preparada disolviendo penicilina potásica en agua destilada hasta conseguir una concentración de 50.000 U.O./ml., efectuando después un filtrado estéril; los volúmenes calculados de solución se añadieron en condiciones de esterilidad al medio de fermentación en las condiciones indicadas, a través de la abertura secundaria del recipiente de fermentación. El ciclo de fermentación se continuó durante 48 horas a partir del inicio de la inoculación.

Cuando se ha completado el ciclo de fermentación, se centrifuga el contenido completo del fermentador (7,1 l.) con una 'súper-centrífuga Sharles'. A continuación se añadieron 14 l. de acetona fría (5° C) al centrifugado; la mezcla resultante se agitó durante una hora para luego dejarla reposar 16 horas a la temperatura de 5° C. Se decanta el líquido sobrenadante y, la mezcla restante, se filtra sobre un filtro de hoja utilizando tela filtrante de vidrio tejido ('Style G-202', de *National Filter Media Co.*, New Haven, Conn.). La masa del precipitado se lavó *in situ* con 300 ml. de solución fría acetona:agua (2:1) a una temperatura de 5° C; a continuación se suspende en 500 ml. de agua exenta de pirógeno y, la acetona residual, se eliminó por evaporación instantánea en un vacío de 5 ml. de mercurio durante un período de 2 horas y media. Terminada la evaporación, se agita la papilla durante 20 minutos a 5° C, se separan los sólidos por filtración a través de paño filtrante de vidrio tejido y se lava con 200 ml. de agua exenta de pirógenos; a los 700 ml. del filtrado y lavados reunidos, se añaden 70 g. de sulfato amónico (100 g./l.), y la mezcla se deja reposar durante 16 horas a 5° C; a continuación, a esta mezcla, se añaden 3,5 g. de 'Hyflo Super Cel' y el precipitado se separa filtrando con un paila filtrante prerrevestida 'Hyflo Super Cel'. Al filtrado resultante se añaden 350 g. de sulfato amónico (500 g./l.), la mezcla se agita hasta que la solución sea completa y se conserva durante 16 horas a 5° C. Los 710 ml. de la mezcla se centrifugan por una 'súper-centrífuga Sharples' y los sólidos separados se disuelven en 35 ml. de agua exenta de pirógenos. Los 37 ml. de la solución resultante se colocan luego en un tubo dializante 'Cellophane' y se dializan durante 24 horas a 5° C contra una solución acuosa circulante que contenía 1,4 % en peso de sulfato amónico y 2,0 % en peso de cloruro sódico, se ajusta a un pH de 7,3 con hidróxido amónico. Los 39 ml. de solución dializada se filtran, en condiciones estériles, a través de un filtro sinterizado ultra-fino.

2.2.9.b. Disociadores de penicilinas

El 10 de agosto de 1960 la empresa alemana *Farbenfabriken Bayer* Aktiengesellschaft presentó, ante el registro español de patentes, un expediente para proteger, por veinte años, un “Procedimiento para la obtención de preparados encímicos [*sic*] disociadores de penicilina”⁷⁴⁶. Los autores mantienen que se puede aumentar la actividad disociadora de las bacterias sobre la penicilina si, previamente, antes de dejarlas reaccionar sobre penicilinas, se cultivan bajo ventilación en caldos que tengan insignificantes cantidades de hidratos de carbono fermentables, a los cuales se les ha agregado ácido fenil-acético, o sus derivados, en cantidades de 0,02% hasta 2%, y durante el crecimiento se introduce dióxido de carbono.

De acuerdo con los autores, es posible obtener una masa de células bacterianas que posea una buena capacidad disociadora de penicilina cuando, como fuente principal de energía y nitrógeno, se emplean mezclas de ácido amínico en forma de hidrolizados de albúmina o mezcla de peptonas o proteínas de alto peso molecular para la preparación del caldo. Es conveniente agregar a tales caldos, además de los iones inorgánicos usuales, tales como $\text{SO}_4=$, $\text{PO}_4=$, Mg^{++} , K^+ , Na^+ , Cl^- , una mezcla de vitamina y material de crecimiento, como puede ser agua de levadura, pero en cantidades reducidas.

Como componente principal del caldo los autores emplean agua de remojo de maíz; ésta contiene fuentes de energía y nitrógeno adecuadas, además de vitaminas y sustancias de crecimiento, así como los iones inorgánicos que se han indicado. A este caldo base se agregan ácido fenil-acético, amida fenil-acética, ácido fenacetúrico, ácido fenacetil-glutamínico u otros derivados del ácido fenil-acético. El dióxido de carbono se puede mezclar con el aire que se ha empleado para suministrar oxígeno a los cultivos o introducirse por separado de la ventilación dentro de los cultivos en crecimiento. La temperatura de los cultivos oscila entre 20°-40° C. Es conveniente que los cultivos crezcan durante 12 a 20 horas a una temperatura entre 20°-35° C; al cabo de este tiempo se separan las células bacterianas y se lavan, entonces reaccionarán sobre penicilinas.

Como el enzima disociador de penicilina está firmemente ligado a la pared de la célula de las bacterias y no a los compuestos citoplasmáticos, terminada la reacción se

Con esta solución de penicilinasa estéril se llena, en condiciones estériles, viales de vidrio tipo I, de 8 ml. de capacidad cada uno; cada vial se carga con 0,61 ml. de la solución, dando un nivel de marcada de 1.000.000 unidades de penicilinasa. Después se secan los viales bajo condiciones estériles, en vacío, en una cámara calentada utilizando el siguiente ciclo de secado: 0-8 horas, 6-10 mm. de mercurio, 35° C; 8-16 horas, menos de 1 mm. de mercurio, 35 ° C. Los diales se han de cerrar en condiciones estériles, con tapones de caucho natural y se tapan con cierres de aluminio. Los productos de penicilinasa exentos de pirógenos resultantes, que se ajustan a concentración isotónica con cloruro de sodio, pueden emplearse directamente para administración intramuscular añadiendo un vehículo o diluyente de agua estéril a los viales medios. Preferentemente se emplean los productos tomando como base la dosificación unidad, en concentraciones comprendidas dentro de los límites de 1.000.0000-5.000.000 unidades de penicilinasa por cm^3 de solución.

⁷⁴⁶ AHOEPM, patente 260.287; la memoria descriptiva consta de nueve hojas, escritas a máquina por una sola cara, firmadas en Madrid, a 10 de agosto de 1960. La empresa figura como establecida en Leverkusen-Bayerwerk (Alemania). Esta solicitud se corresponde a la presentada en Alemania, con fecha 24 de septiembre de 1959, bajo el número F-29.458-IVa/30h. La patente española fue concedida el 15-IX-1960 y publicada el 1-XI-1960.

puede recuperar el material enzimático de los productos de disociación de penicilinas mediante centrifugación, para ser empleado en ulteriores preparaciones⁷⁴⁷.

Grupo de patentes	Período	Número de patentes
1. Los extractos penicilínicos	1945-1956	6
2. Producción de penicilina en condiciones sumergidas	1949-1955	4
3. Sales alcalinas de penicilina	1945-1956	33
4. Penicilinas procaínicas	1948-1955	16
5. Penicilinas biosintéticas	1950-1962	44
6. Penicilinas asociadas a otros antibióticos	1956-1960	3
7. Penicilinas sintéticas: derivados del ácido 6 amino-penicilánico (6-APA)	1959-1963	46
8. Anhidropenicilinas	1962	1
9. Penicilinasas	1958-1960	2
Total		155

2.3. Las empresas interesadas en el registro de penicilinas

Las primeras empresas interesadas en el registro de penicilinas parecen ser españolas; el 17 de marzo de 1945, *Destilaciones Aromáticas*, domiciliada en Bilbao, más relacionada con los procesos fermentativos que con la industria farmacéutica, registra un “Procedimiento de obtención de penicilina y otras drogas medicinales partiendo de microorganismos llamados hongos” (AHOEPM, patente 169.274), que no habría de tener continuación.

Las patentes de empresas extranjeras relacionadas con la producción de penicilina en España comienzan a registrarse en los meses finales de 1945; las introducen un par de empresas británicas, *Herts Pharmaceuticals Limited* / *Roche Products Limited* (AHOEPM, patente 170.951) y la norteamericana *American Cynamid Company* (AHOEPM, patente 171.813); la primera ofrece un modelo de vendaje bacteriostático impregnado en penicilina; la segunda nos acerca a los modelos de Monroe J. Romansky y George E. Rittman para aumentar la estabilidad de las penicilinas, potenciando su administración por vía oral.

⁷⁴⁷ Los autores completan la memoria descriptiva con cinco ejemplos prácticos; exponemos el primero de ellos: una solución de agua de remojo de maíz (al 2% en volumen) de 160 litros, se ajusta a pH 7,0 y se calienta durante 30 minutos a 120° C; se deja enfriar y se clarifica la solución por centrifugado; se agrega 5% de glucosa, se esteriliza durante 40 minutos a 110° C en el fermentador. Este caldo se inyecta, después de enfriarlo, con 400 cm³ de un cultivo de *Escherichia coli* ATCC 11105. El preparado obtenido se ventila con aire a razón de 150 litros/minuto en un mecanismo agitador de velocidad angular de 150 revoluciones/minuto. Se cultiva durante 17 horas a 31° C. Las células bacterianas se centrifugan del caldo, se lavan con 16 litros de solución de fosfato 1/15 molar de pH 6,0 y, después de centrifugar, se suspenden en una solución de fosfato 1/5 molar de pH 7,0. En esta suspensión se disuelve penicilina G seca hasta una concentración de 5.000 U.I./cm³. La preparación se deja durante 12 horas a 37° C y, al cabo de ese tiempo, solo contiene 4.200 U.I./cm³. Un filtrado de una muestra de esta suspensión se hizo reaccionar con cloruro fenil-acético y se consiguió reactivar la producción de penicilina G llegando a tener en la suspensión hasta 4.850 U.I./cm³.

Se inicia así un proceso, relativamente continuo, de introducción de patentes relativas a procedimientos relacionados con las penicilinas; en los primeros meses de 1946 será la potente empresa estadounidense *Hoffmann-La Roche Inc.* quien registre sus modelos industriales de producción de sales penicilínicas (AHOEPM, patentes 172.377; 174.340), seguida de la francesa *Carbonisation et Charbons Actifs S.A.* (AHOEPM, patente 172.503). De inmediato se añadirá, bajo marca británica, *Glaxo Laboratories Limited* (AHOEPM, patentes 176.397; 176.753; 183.316), que habría de copar una parte importante del mercado de estos productos, y la norteamericana *The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.* (AHOEPM, patentes 182.483; 182.707).

En el verano de 1948 se incorporarían al registro español los primeros expedientes de la danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* (AHOEPM, patentes 184.612; 184.673), otra de las empresas que, bajo marca danesa o italiana (*Leo Industrie Chimique Farmaceutiche*, AHOEPM, patente 229.788), también habría de tener fuerte presencia en nuestro país, a tenor de los datos de registro de patentes. Del otoño de éste 1948 datan los primeros registros de *Bristol Laboratories Inc.* (AHOEPM, patente 185.490) y de marzo de 1949 los primeros *Merck & Co. Inc.* (AHOEPM, patente 187.312; 187.313; 187.371; 187.378).

No fueron pocos los españoles que, al albur del éxito popular de la penicilina⁷⁴⁸, intentaron obtener algún tipo de beneficio; al parecer ninguno de ellos tuvo especial éxito salvo, quizás, los procedimientos aportados por el catalán Enrique Bassas Grau, iniciados en el febrero de 1949 y continuados en años sucesivos (AHOEPM, patentes 186.907; 189.651; 195.938).

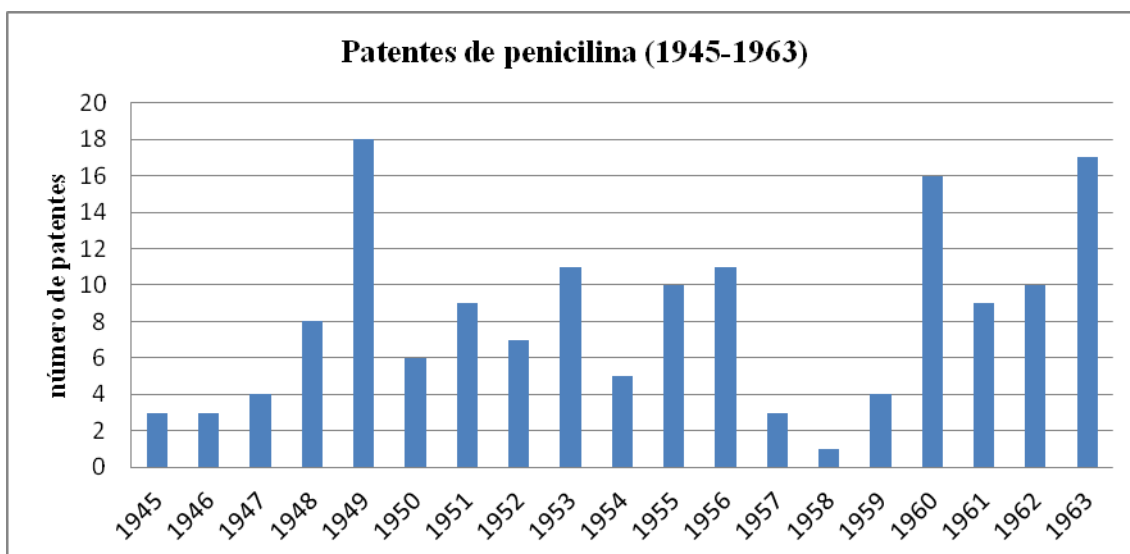
Es posible que la introducción de procedimientos, al menos parcialmente novedosos, para elaborar penicilinas debidos al ingenio hispano deba retrotraerse hasta el otoño de 1952, en octubre de este año el *Instituto de Biología y Sueroterapia* registrará un “Procedimiento para estabilizar las disoluciones de penicilina” (AHOEPM, patente 205.780); apenas unos días después, será la *Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.* quien registre otro par de procedimientos para preparar nuevos derivados de penicilina dotados de poder difusor y retardador (AHOEPM, patentes 206.205; 206.255); a la zaga irá *Antibióticos S.A.* quien, en diciembre de éste 1952, presentará tres expedientes relacionados con la obtención de amino-ésteres de la penicilina (AHOEPM, patentes 206.653; 206.654; 206.655). Luego, en el verano de 1953, será el *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)* quien registre sus nuevos procedimientos para obtener sales estables de penicilinas (AHOEPM, patente 209.812).

En las líneas que siguen analizamos, con más detenimiento, cómo se incardinan los distintos procesos registrados por las empresas interesadas en la producción de penicilinas ante la Administración española; nos ocuparemos ahora de comentar algunos datos cuantitativos sobre el interés por registrar estos procedimientos.

La distribución del número de expedientes de patentes de penicilinas, presentados en España, ordenados por años, se refleja en el gráfico que sigue a estas

⁷⁴⁸ Cf. Raúl RODRÍGUEZ NOZAL. “¿Fortuna o desdicha? La entrada de la penicilina en la España de la autarquía, un nuevo desafío para la farmacia y la industria farmacéutica”. En: Antonio González Bueno, Guillermina López Andújar, María Dolores Cabezas López, Carmen Martín Martín, Juan Esteva de Sagra (ed.). *Homenaje al Prof. Dr. José Luis Valverde*: 515-550. Granada: SDUHFE / Universidad de Granada, 2011.

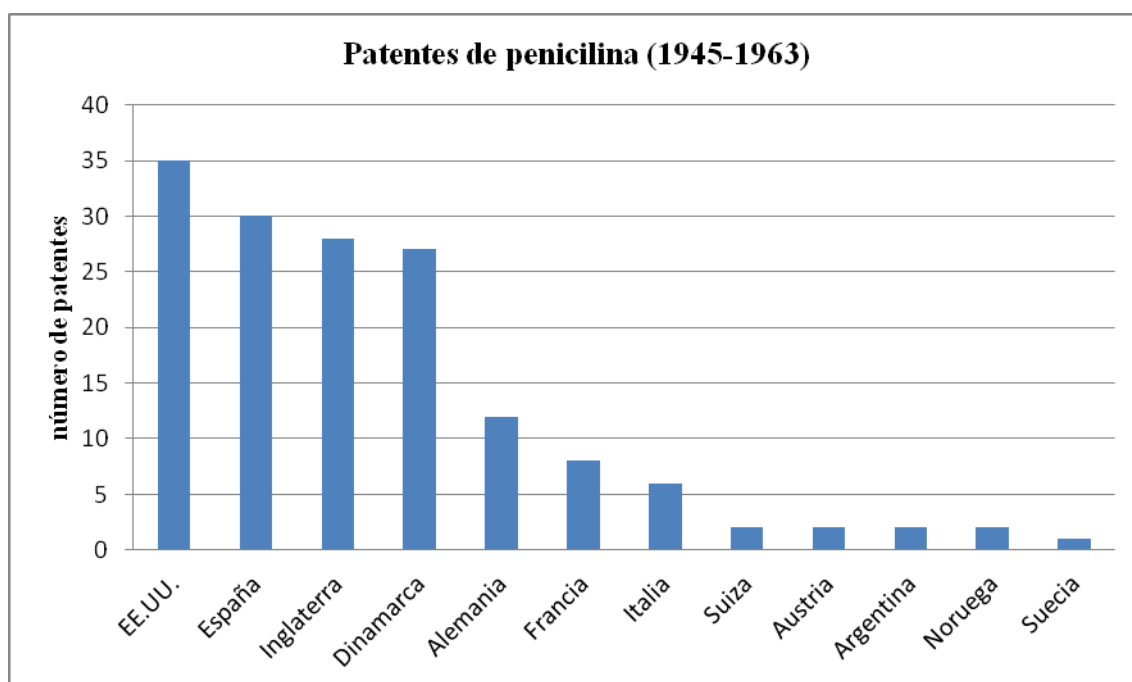
líneas; en la tabla, se organizan estos mismos datos en función de los países en que fijaron su residencia las empresas interesadas en su registro.



Distribución del número de patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)										
Año	1945	1946	1947	1948	1949	1950	1951	1952	1953	1954
Patentes	3	3	4	8	18	6	9	7	11	5
Año	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961	1962	1963	Total
Patentes	10	11	3	1	4	16	9	10	17	155

Distribución del número de patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)						
Año	España	Inglaterra	EE.UU.	Francia	Dinamarca	Suecia
1945	1	1	1	-	-	-
1946	-	-	2	1	-	-
1947	2	2	-	-	-	-
1948	1	1	3	-	3	-
1949	5	-	8	1	4	-
1950	1	-	-	1	4	-
1951	-	-	6	-	1	1
1952	6	-	-	1	-	-
1953	1	3	1	-	2	-
1954	2	-	1	-	2	-
1955	5	-	2	-	-	-
1956	2	-	-	1	3	-
1957	-	2	-	-	1	-
1958	-	-	1	-	-	-
1959	-	1	-	-	2	-
1960	-	5	2	1	3	-
1961	-	4	2	1	2	-
1962	2	2	2	-	-	-
1963	2	7	4	1	-	-
Total	30	28	35	8	27	1

Año	Alemania	Austria	Italia	Argentina	Noruega	Suiza
1945	-	-	-	-	-	-
1946	-	-	-	-	-	-
1947	-	-	-	-	-	-
1948	-	-	-	-	-	-
1949	-	-	-	-	-	-
1950	-	-	-	-	-	-
1951	1	-	-	-	-	-
1952	-	-	-	-	-	-
1953	3	1	-	-	-	-
1954	-	-	-	-	-	-
1955	-	-	2	1	-	-
1956	1	-	1	1	2	-
1957	-	-	-	-	-	-
1958	-	-	-	-	-	-
1959	-	-	1	-	-	-
1960	4	1	-	-	-	-
1961	-	-	-	-	-	-
1962	2	-	2	-	-	-
1963	1	-	-	-	-	2
Total	12	2	6	2	2	2



Son las empresas norteamericanas y británicas –en ocasiones con intereses entrecruzados- quienes copan, entre las extranjeras, el registro español de patentes; no obstante, la firma que más expedientes presenta es la danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, hasta un total de 22, la práctica totalidad de los registrados bajo esta nacionalidad, sin contar entre ellos los firmados por otras filiales del grupo, como la italiana *Leo Industrie Chimique Farmaceutiche*, con sede oficial en Roma (Italia), lo que parece poner de manifiesto los particulares intereses de esta empresa por el mercado español de penicilinas.

La presencia de otros países tienen menor peso; buena parte, tanto de las empresas francesas (*Carbonisation et Charbons Actifs S.A.*, *Société des Usines Chimiques Rhone Poulenc*, *Les Laboratoires Français de Chimotherapie*) como de las alemanas (*Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft*, *Farbwerke Hoeschst Aktiengesellschaft* [Meister Lucius & Brüning]), estaban asentadas en nuestro país y responden a un modelo de internacionalización de sus productos, al que también concurren otras empresas como la suiza *J. R Geigy A.G.* o la italiana *Farmaceutici Italia S.A.* Un caso especial lo constituye el empresario argentino, Sebastián Bagó Basagañas, de origen hispano y profesionalmente vinculado, en sus inicios, a los *Laboratorios Cusi* lo que, quizás, pueda explicar el interés de este laboratorio, el único sudamericano, por registrar en España sus patentes relacionadas con la penicilina.

2.3.1. Las empresas españolas

La primera de las patentes españolas de penicilinas de la que tenemos noticia corresponde a *Destilaciones Aromáticas S.L.*, una empresa con sede en Bilbao, alejada del ámbito farmacéutico pero bien atenta, como los industriales azucareros de Hawái, al futuro negocio que supondría la producción de este antibiótico; la patente, presentada a registro el 17 de marzo de 1945 y aprobada tres días después, se limita a indicar las cuatro fases de que consta el proceso de fabricación del extracto penicilínico: fermentación, estabilización, depuración y concentración y a insistir en la conveniencia de que el material industrial utilizado sea de acero vitrificado (AHOEPM, patente 169.274).

Un par de años después de esta patente ‘pionera’, el 31 de marzo de 1947, un par de empresarios: el español Julián Cardavilla del Barrio y el ruso Miguel Veníos, ambos residentes en Madrid, presentan una propuesta para lograr una mayor estabilidad en el caldo penicilínico obtenido mediante cultivo sintético ‘Czapek-Dox’⁷⁴⁹, consiste en la adición de lanolina y grasas hidrogenadas, de modo que se formara un tampón al que añaden, con ánimo de aumentar la estabilización, algunos antisépticos (AHOEPM, patente 177.419).

Puestos a patentar sustratos sobre los que transferir la penicilina a los usuarios, en mayo de 1947, un grupo de empresarios catalanes, probablemente vinculados al sector textil: José Romeu Guardiola, Isidro Alsina Argemí, Pedro Torrella Oliva y Carlos Más Gibert, presentaron un expediente para introducir, en el mercado español, unos ‘chicles’, con propiedades refrescantes, en cuya composición incluyen mentol y ácido cítrico acompañados de una esencia adecuada para aromatizar y refrescar la boca; a este producto se le incorpora penicilina, con lo que intentan prevenir o curar enfermedades bucales (AHOEPM, patente 178.294). Apenas un año más tarde, en mayo de 1948, será un empresario valenciano, Jesús Barrachina Aparisi, quien se interese por lograr unos ‘supositorios de penicilina’ (AHOEPM, patente 183.655).

No parece que ninguno de estos ‘ingenios’ tuviera éxito, probablemente nunca fueron comercializados, pero constituyen una prueba del interés de los industriales españoles -todos ellos provenientes de campos no afines a la terapéutica- por un mercado que, como bien intuían, tendría un notable éxito económico.

⁷⁴⁹ Este método, utilizado por algunas instalaciones hospitalarias para lograr conservar la actividad de la penicilina durante un tiempo mayor del habitual, fue dado a conocer por R.M. SANDERCROFT, “The production and assay of crude penicillin filtrate in the hospital laboratory”. *Bulletin of the Institute of Medical Laboratory Technology*, [Monographs, 1944]: 56-58. Londres, 1944.

Hemos de esperar a los inicios de 1949 para que un médico de prestigio, el barcelonés Enrique Bassas Grau (1917-1979) se ocupe de trabajar sobre un sistema que permita transformar la penicilina sódica comercial en una sal insoluble cristalina, de modo que el proceso de cristalización ocurra fuera del frasco de penicilina, con lo que se evitaba la obstrucción de las agujas y se facilitaba el deslizamiento del émbolo en el momento de la inyección (AHOEPM, patente 186.907). La solución fuera de nuestras fronteras estaba ya comercializada: penicilina-procaína en suspensión acuosa, ampollas que contienen la sal de procaína desecada incorporada a un coloide hidrófilo para mantener la suspensión cuando se le añade agua o una solución salina, pero el sistema no estaba comercializado en nuestro país [1949] y resultaba oneroso; en esos momentos, en España, solamente se importaba la penicilina en forma de sal sódica amorfa o penicilina G cristalizada, por lo tanto, no se podía disponer de este nuevo procedimiento terapéutico. La propuesta de este autor trata de competir, empleando un sistema de preparación extemporánea, con la solución industrial ya comercializada fuera de nuestras fronteras a las que el mercado español no tiene acceso, a la par que elimina los cristales mantenidos en suspensión en las preparaciones comerciales.

Basándose en principios similares, en los comienzos de septiembre de éste 1949, Enrique Bassas propondrá un procedimiento para transformar la penicilina sódica comercial en un producto resistente a la penicilinasas intestinal, apta por tanto para su administración oral (AHOEPM, patente 189.651); el proceso consiste en transformar la sal sódica de la penicilina G en una sal de penicilina-aluminio (o penicilina-cobalto), activa por vía gástrica; para ello se limita a agregar, a la penicilina comercial, en forma de solución precipitante, una sal de aluminio (o una sal de cobalto) junto a un producto estabilizador, en general cualquier derivado benzoico que tenga la propiedad de destruir la penicilinasas intestinal. Como en el caso anterior, la solución es extemporánea, ya que la aplicación del procedimiento se realiza en el propio frasco de penicilina comercial, dotando a éste de los acoplamientos adecuados para contener, por separado, los elementos de adición que se han indicado. Insistiendo en esta línea, en diciembre de 1949 propone mejoras en este procedimiento, sometiendo a los penicilinos obtenidos a un proceso de separación por filtración al vacío en atmósfera inerte y baja temperatura, con lo que obtiene polvos transformables en formas sólidas, con lo que dota de cierta producción industrial al proceso, a la vez que le permite incorporar derivados de sulfamidas, con los que pretende aumentar la acción antibiótica del preparado (AHOEPM, patente 195.938).

Las propuestas desarrolladas por los *Laboratorios Vigoncal S.A.*, de Madrid, en mayo de 1949, siguen la misma línea trazada por Enrique Bassas: en este caso la penicilina G del comercio, soluble y de absorción y eliminación rápida, es transformada extemporáneamente, por la acción de una solución acuosa de clorhidrato de para-amino-benzol-dietil-amino-metanol, en una suspensión acuosa de penicilina insoluble, que se absorbe y se elimina lentamente, prolongando así su tiempo de acción terapéutica útil (AHOEPM, patente 188.443).

No muy distinta es la propuesta de la empresa madrileña EFEYN S.A. quien, en julio de 1949, propone la transformación de la penicilina disponible en el comercio en penicilina-procaína, mediante la adición, de forma extemporánea, de una solución de clorhidrato de procaína al 2%, que la propia empresa pretende comercializar en ampollas de 5 cc.; en realidad se trata de conseguir un vehículo que disuelva la penicilina sódica y, en parte, la transforme en procaína-penicilina (AHOEPM, patente 189.110). Con ello se dispondría de un sistema con el que obtener una preparación más fluida de penicilina a la temperatura ambiente, lo que facilitaría el llenado de la jeringa

y el que la inyección fuera más fácil de realizar, reduciendo las molestias locales, el dolor, las induraciones y abscesos que se presentan con la fórmula de Romansky y Rittman, de suspensión en aceite y cera⁷⁵⁰, que comenzaba ya a estar en desuso por problemas técnicos en la administración del producto. Apenas unos días después, este mismo julio de 1949, esta empresa madrileña retoma su propuesta añadiendo a su solución de clorhidrato de procaína, aceite de cacahuete y mono-estearato de albúmina, todo con ánimo de que la emulsión aceite/agua retarde la reabsorción de penicilina, manteniendo una concentración útil en sangre durante mayor tiempo (AHOEPM, patente 189.233).

El *Instituto de Biología y Sueroterapia*, una empresa farmacéutica ubicada en Madrid, diseña, en octubre de 1952, un procedimiento novedoso para aumentar la estabilidad de las disoluciones de penicilina sin recurrir a las preparaciones extemporáneas; se fundamenta en la acción de las proteinasas sobre la penicilinasas; según estos autores, es posible estabilizar la penicilina en disolución sometiéndola a la acción de una proteinasa que destruya el fermento y no altere la penicilina. Junto a este procedimiento, de ‘ataque’ pues lo que realmente se hace es ‘atacar’ el ‘elemento nocivo’ que hay en la disolución de penicilina e incapacitarlo para que no produzca su acción perjudicial, presentan una variante basada en la ‘conurrencia’, destinada a estabilizar las soluciones de penicilina mediante la adición de productos que, sin tener la acción farmacológica de la penicilina, presenten una estructura química semejante, para que sobre ellos actúe la penicilinasas (AHOEPM, patente 205.780).

El desarrollo de penicilinas semi-sintéticas, por empresas españolas, comienza en la década de 1950. De noviembre de 1952 data la propuesta de la *Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.*, que permite obtener nuevos derivados de penicilina de gran poder difusor, caracterizados porque se preparan ésteres dialquil-amino-alquílicos de penicilina, haciendo reaccionar penicilina ácida con dialquil-bromo-alquil-aminas, en la proporción de dos moles de base por mol de ácido de penicilina en solución homogénea; debido a la gran difusibilidad de estos ésteres, principalmente por los tejidos pulmonares, se constituyen en un producto especialmente apto para la terapéutica pulmonar (AHOEPM, patente 206.205).

Esta misma empresa barcelonesa, *Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.* es responsable de preparaciones de sales de complejos salinos de la penicilina con bases orgánicas, en un intento de lograr un producto de gran estabilidad frente a un amplio campo de valores de pH y, fundamentalmente, dotado de una alta insolubilidad, lo que le confiere un marcado poder retardador. Su propuesta, formulada en noviembre de 1952, se concreta en la preparación de la base N,N'-dibencil-etilén-diamina y en su condensación con la penicilina (AHOEPM, patente 206.255). El laboratorio promotor señala, como una circunstancia favorable de su procedimiento, el que todas las materias primas necesarias para desarrollarlo se encuentran en España.

No muy diferente parece la propuesta que, en enero de 1954, formula la firma barcelonesa *Laboratorios del Dr. Esteve S.A.* relativa al proceso de fabricación de un derivado de la penicilina G, de acción prolongada, en que esta sustancia se combina con N,N'-dibencil-etilén-diamina, probablemente un inicio de su colaboración con los *Laboratorios Atral L^{tda}* de Lisboa, con quien, pocos meses después, en septiembre de éste 1954, presentarán una invención conjunta; el detalle con que los autores de la

⁷⁵⁰ Cf. Monroe J. ROMANSKY, George E RITTMAN. “A method of prolonging the action of penicillin”. *Science*, 100(2592): 196-198. Washington DC., 1944.

memoria detallan su técnica operativa, así como las cantidades de sustancias reaccionantes apropiadas, hacen pensar que el proceso les era bien conocido (AHOEPM, patente 213.291).

La propuesta conjunta de los *Laboratorios del Dr. Esteve S.A.* de Barcelona y los *Laboratorios Atral L^{tda}* de Lisboa, a la que acabamos de hacer alusión, atiende también a las penicilinas con bases orgánicas, en particular, a las combinaciones con N,N'-dibencil-etil-diamina; con ánimo de aumentar su solubilidad, proponen un método de extracción del ácido penicilínico de su solución en acetato de amilo, que consiste en emplear una solución de la sal de N,N'-dibencil-etileno-diamina de un ácido carboxílico débil en un disolvente no miscible con el acetato de amilo, lo que permitirá utilizarlo para la obtención, en forma cristalina, de la correspondiente sal de penicilina; este producto, capaz de disolver apreciablemente el penicilinato de N,N'-dibencil-etileno-diamina sin ser miscible con el acetato de amilo, es la formamida (AHOEPM, patente 217.456).

Los intereses de *Antibióticos S.A.*, una empresa con sede en Madrid, parecen centrarse, en la primera mitad de la década de 1950, en los procedimientos de obtención de amino-ésteres de la penicilina. El proceso de esterificación de las penicilinas tratando sus sales de plata con yoduros de alcoholó fue estudiado, en los comienzos de la década de 1940, por Edward Abraham, Ernst Boris Chain y E.R. Holiday⁷⁵¹; para conseguir este fin se utilizó la reacción de los diazo-alcanos con la penicilina o sus sales⁷⁵²; A. Vern McIntosh Jr., Elizabeth M. Meinzer y Robert H. Levin propusieron, en la reunión de la *American Chemical Society* celebrada en Chicago, en la primavera de 1948, un método basado en el tratamiento del anhídrido de la bencil-penicilina con un alcohol que posea un grupo básico⁷⁵³, pero como el anhídrido es inestable, este procedimiento exige una técnica complicada y de él se obtienen rendimientos bajos, con lo cual no se puede emplear industrialmente. En los métodos señalados, es necesario aislar el halogenuro de alcoholó a partir del hidro-halogenuro del haluro de alcoholó, con un grupo básico; esta operación presenta dificultades y proporciona bajos rendimientos; además, debido a la inestabilidad de los halogenuros de dietil-amino-etilo, hay que utilizarlos recién preparados.

Los investigadores adscritos a la empresa *Antibióticos S.A.* presentan, en diciembre de 1952, tres métodos destinados a solventar la inestabilidad de los anhídridos de penicilina; con escasas variaciones, los tres procedimientos registrados tratan de la obtención de amino-ésteres de la penicilina, esencialmente caracterizados porque una sal de penicilina es tratada con un hidro-halogenuro de haluro beta-dialcohol-amino-alcoholó, obteniéndose así un amino-éster de penicilina que después se aísla en forma de sal. En el primero de los métodos patentados los autores proponen tratar el hidro-halogenuro del haluro del alcohol básicamente sustituido, con un extracto de los caldos de cultivo que contengan penicilina; el método supone dos ventajas

⁷⁵¹ Edward ABRAHAM, Ernst Boris CHAIN, E.R. HOLIDAY. "Purification and some physical and chemical properties of penicillin: with a note on the spectrographic examination of penicillin preparations". *The British Journal of Experimental Pathology*, 23(3): 103-119. Londres, 1942.

⁷⁵² K. MEYER, G.L. HOBBY, E. CHAFFEE. "On esters of penicillin". *Science*, 97(2513): 205-206. Washington, 1943; Max FRANKEL, Ephraim KATCHALSKI. "Derivatives of N-Carboxy- α -amino acid esters". *Journal of the American Chemical Society*, 65(9): 1670-1674. Washington DC, 1943.

⁷⁵³ A. Vern MCINTOSH Jr., Elizabeth M. MEINZER, Robert H. LEVIN. "Steroid acids and their transformation products. III. Desulfurization of thiol esters of 3(β)-hydroxy-5-cholenic and -bisor-5-cholenic acids". *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2955-2958. Washington DC, 1948.

sustanciales: no hay que tratar la sal de penicilina cristalizada con el haluro de beta-dialcohol-amino-alcohol, sino con un extracto del caldo de fermentación, evitando de esta forma las pérdidas de sustancia, que suelen ser grandes cuando se quieren obtener penicilinas en estado comercial puro, y también los gastos que supone el empleo de productos químicos y horas de trabajo necesarias para fabricar la sustancia deseada; además se emplea un hidro-halogenuro del haluro de beta-dialcohol-amino-alcohol, que es un producto comercial, no hay necesidad de aislar el halogenuro a partir de aquel, lo que también se traduce en bajada de costes económicos (AHOEPM, patente 206.653). El segundo de los procedimientos trata la sal de penicilina, bien sea metálica u orgánica, con el hidro-halogenuro del halogenuro del beta-dietil-amino-etilo, o del beta-dimetil-amino-etilo; estos productos son obtenidos a escala comercial, sin que sea necesario liberar el halogenuro de beta-dialcohol-amino-etilo, evitándose así una serie de operaciones y el empleo de productos químicos con la desventaja de obtener un mal rendimiento y la necesidad de prepararlo extemporáneamente (AHOEPM, patente 206.654). El tercero de los procedimientos de esta serie no trata la sal de penicilina pura con halogenuro de beta-dialcohol-amino-alcohol, sino con un extracto del caldo de fermentación que contenga penicilina, previamente activado con cloruro de beta-dimetil-amino-etilo u otro halogenuro de alcohol-amino-alcohol; al añadir al producto de la reacción una disolución etérea de cloruro de hidrógeno y después tratarlo con yoduro alcalino o con ácido yodhídrico se obtiene un hidro-yoduro, por ejemplo el del éster dietil-amino-etílico del ácido bencil-penicilínico (AHOEPM, patente 206.655).

La producción de penicilinas biosintéticas por *Antibióticos S.A.* les llevó a formular algunas modificaciones en el proceso de fabricación; en septiembre de 1955 señalan haber comprobado que no es necesario el asilamiento y la purificación de los precursores que se adicionan a la fuente de nitrógeno utilizada como alimento por el microorganismo, basta con añadir una pequeña cantidad de ese mismo hidrolizado previamente tratado con cloruro del precursor. Este nuevo compuesto añadido se combina con las proteínas y los aminoácidos contenidos en el 'corn step' y los aminoácidos hidrolizados, formando un complejo que no corresponde a una fórmula química definida y que es perfectamente aprovechado por el hongo para realizar la síntesis de la penicilina que se desee. Se evitan así esos dos pasos engorrosos, sobre todo en caso de los aminoácidos (AHOEPM, patente 223.974).

El *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)* orientó sus trabajos, al menos durante los primeros años de la década de 1950, hacia los procedimientos de obtención de sales estables de penicilina, capaces de soportar altas temperaturas sin perder eficacia terapéutica; en junio de 1953 registró un proceso caracterizado porque una solución de penicilina se mezcla con una solución de diclorhidrato de bis-(fenil-metilén-amino)-etano, sujeto a una delicada estabilidad de la reacción (AHOEPM, patente 209.812).

A fines de 1955, los investigadores de *Antibióticos S.A.* muestran su interés por la penicilina G benzatina (penicilina G dibencil-etileno-diamínica), que presenta niveles sanguíneos más prolongados dada su poca solubilidad en agua, lo que ocasiona que se absorba y excrete lentamente por el organismo, cualidad que le ha valido el nombre de 'penicilina retardada' (AHOEPM, patente 223.973). Las penicilinas se hacen reaccionar en forma de sales sódicas o potásicas, o su sal trietil-amínica en solución acuosa, con una disolución también acuosa de una sal de dibencil-etileno-diamina, preferentemente una sal de ácido orgánico, de las que, por su mayor solubilidad, es aconsejable usar el acetato.

En estas mismas fechas, noviembre de 1955, el *Instituto de Farmacología Española* (*Fundación Marqués de Urquijo S.L.*) se interesa también por la producción de dipenicilina V-benzatina, un producto con estabilidad suficiente tanto para garantizar el paso del antibiótico activo a la cavidad intestinal, como para suspenderse en agua o en soluciones acuosas sin alterar perceptiblemente la concentración de iones hidrógeno, pudiendo por tanto ser inyectada por vía parenteral. El procedimiento de obtención de dipenicilina V-bezantina se basa en hacer reaccionar penicilina V ácida con bezantina base, en un disolvente adecuado y en concentraciones suficientes para que, al juntarse ambos líquidos, se exceda la penicilina V benzatina; ésta es extraída, por medio de disolventes orgánicos, en forma de penicilina V ácido; por lo tanto, el procedimiento resulta ventajoso para la obtención de la nueva sal dipenicilina V benzatina, ya que no es necesario aislarla en forma de sales alcalinas para obtener sales dibencil-etilén-diamícas de la penicilina V; al ser la benzatina una base soluble, en todas las proporciones, y en gran número de disolventes orgánicos, se dispone de un margen muy amplio de concentraciones y disoluciones en lo referente a los líquidos madre que aporten a la reacción final la molécula bezantínica (AHOEPM, patente 224.971).

En su interés por trabajar con ‘penicilinas retardadas’, en diciembre de 1955 el *Instituto de Farmacología Española* (*Fundación Marqués de Urquijo S.L.*) registra la combinación de penicilina G con quinina; con ello se consigue una nueva sal de penicilina que tiene un grado de insolubilidad intermedio entre el de la penicilina procaína y la penicilina benzatina, a la par que la asociación con la quinina le confiere la actividad antibacteriana que ella posee; no es éste un procedimiento original, sus autores reconocen que había sido ya empleado, con buenos resultados, fuera de nuestras fronteras, pero aún no había sido divulgado, ni practicado, ni puesto en ejecución en España, por ello solicitan una patente de introducción para la que aportan su propia experiencia en el trabajo, tanto con sales de penicilina como de quinina (AHOEPM, patente 225.437). Casi una variante de éste es la propuesta presentada, apenas unos días después, por esta misma empresa, destinada a elaborar sales poco solubles de penicilina V-quinina; el procedimiento de obtención de penicilina V-quinina se fundamenta en una reacción química de doble descomposición; los investigadores del *Instituto de Farmacología Española* han comprobado, en su trabajo experimental, que al juntar soluciones acuosas de penicilina V, en forma de sal soluble en agua, con soluciones acuosas de sales de quinina, aún en concentraciones relativamente bajas, precipita la sal de penicilina V de quinina, pues es muy poco soluble en agua; este proceso es muy cómodo ya que, a diferencia de lo que ocurre con la obtención de sales de penicilina G-quinina, la sal que se obtiene lo hace en estado cristalino, sin mostrar tendencia a precipitar en estados amorfos, que de ordinario son más impuros, difíciles de manejar y que se secan con lentitud (AHOEPM, patente 225.454).

De comienzos de 1956 data el procedimiento, registrado por la empresa barcelonesa *Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A.*, para la preparación de sales del ácido penicilánico con bases etilén-diaminas disustituídas; estas sales se logran haciendo reaccionar el ácido penicilánico en solución cetónica con una solución acuosa de di-acetato de la etilén-diamina di-sustituída, agitando y enfriando; los autores recomiendan emplear di-acetato de N,N'-dibencil-etilén-diamina, para el que aportan un ensayo experimental (AHOEPM, patente 225.960).

En marzo de 1956 una nueva entidad española, *Sociedad Española Basipa S.A.* asociada al empresario Edelmiro Borrás López, declara su interés por el negocio de la penicilina al patentar una técnica de estabilización de los extractos hidro-alcohólicos, crudos de penicilina asociados a sales mercuriosas, tanto de ácidos minerales como de

ácidos orgánicos, utilizando para ello la presencia de compuestos sulfo-carboxílicos aromáticos o terpénicos (AHOEPM, patente 227.116). Más parece un interés por copar un espacio de posible éxito comercial que una propuesta real de desarrollo industrial.

A la sombra de *Merck Sharp & Dohne Internacional*, el *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)* registró, en octubre de 1962, un par de procedimientos para obtener sales de penicilina con efecto antihistamínico y antiserotónico, partiendo de derivados fenoxi-metílicos (penicilina V) (AHOEPM, patentes 280.469; 280.470)⁷⁵⁴.

En julio de 1963, el farmacéutico catalán José Robert Mestre, sin duda en representación de los *Laboratorios Robert*, que comienzan a tener marcada presencia nacional en el gozne de las décadas de 1960-1970, propone un procedimiento de obtención de penicilinas partiendo de una disolución del 4-difenil-glioxal que se añade, a la temperatura ordinaria, a una sal hidrosoluble del ácido 6-amino-penicilánico, para obtener nuevas penicilinas (AHOEPM, patente 289.688); apenas unos días después, en los comienzos de agosto de éste 1963, volvería a registrar un procedimiento mediante el que hacer reaccionar ácido 6-amino-penicilánico con bromuro de alfa-bromo-fenil-acetilo (AHOEPM, patente 291.104).

Las empresas españolas con patentes de penicilinas (1945-1963)		
<i>Destilaciones Aromáticas</i> [Bilbao]		
1945. 17-III	169.274	Procedimiento de obtención de penicilina y otras drogas medicinales partiendo de microorganismos llamados hongos.
<i>Julián Cardavilla del Barrio / Miguel Veníos</i> [Madrid]		
1947. 31-III	177.419	Procedimiento de estabilización de la penicilina para preparados de uso exterior.
<i>José Romeu Guardiola</i> [Barcelona] / <i>Isidro Alsina Argemí</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Pedro Torrella Oliva</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Carlos Más Ginert</i> [Barcelona]		
1947. 19-V	178.294	Procedimiento de preparación de tabletas de goma para mascar con penicilina incorporada.
<i>Jesús Barrachina Aparisi</i> [Valencia]		
1948. 11-V	183.655	Procedimiento industrial de preparación de la penicilina de forma que sea susceptible de administrarse por vía rectal.
<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona]		
1949. 5-II	186.907	Procedimiento para la preparación de suspensiones acuosas de penicilina.
1949. 8-IX	189.651	Procedimiento para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones de penicilina activa por vía inyectable o gástrica.
1950. 26-XII	195.938	Certificado de adición a la patente 189.651 [Procedimiento para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones de penicilina activa por vía inyectable o gástrica].
<i>Laboratorios Vigoncal S.A.</i> [Madrid]		
1949. 31-V	188.443	Un procedimiento químico industrializable, para obtener una suspensión acuosa de penicilina insoluble.

⁷⁵⁴ En ambos procedimientos se utiliza, como elemento fundamental, 'Periactin' (clorhidrato de ciproheptadina) comercializado por *Merck Sharp & Dohne Internacional*.

EFEYN, S.A. [Madrid]		
1949. 16-VII	189.110	Un procedimiento para la preparación de un vehículo para conseguir la acción sostenida de la penicilina.
1949. 27-VII	189.233	Procedimiento para la preparación de un vehículo para conseguir la acción sostenida de la penicilina.
Instituto de Biología y Sueroterapia [Madrid]		
1952. 14-X	205.780	Procedimiento para estabilizar las disoluciones de penicilina.
Unión Químico-Farmacéutica, S.A.E. [Barcelona]		
1952. 10-XI	206.205	Procedimiento para preparar nuevos derivados de penicilina dotados de gran poder difusor.
1952. 13-XI	206.255	Procedimiento para la preparación de una sal de penicilina dotada de gran poder retardador.
Antibióticos S.A. [Madrid]		
1952. 5-XII	206.653	Procedimiento de obtención de amino-ésteres de la penicilina.
1952. 5-XII	206.654	Procedimiento de obtención de amino-ésteres de la penicilina.
1952. 5-XII	206.655	Procedimiento de obtención de amino-ésteres de la penicilina.
1955. 14-IX	223.973	Procedimiento de obtención de derivados de penicilinas insolubles o poco solubles en agua.
1955. 14-IX	223.974	Procedimiento de obtención de derivados de penicilinas insolubles o poco insolubles en agua.
Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo, S.L.) [Madrid]		
1953. 16-VI	209.812	Nuevo procedimiento de obtención de una sal estable de penicilina.
1955. 12-XI	224.971	Procedimiento de obtención de una nueva sal de penicilina.
1955. 6-XII	225.437	Procedimiento de obtención de penicilina G–quinina.
1955. 7-XII	225.454	Procedimiento de obtención de sales poco solubles de penicilina V-quinina.
1962. 24-X	280.469	Procedimiento de obtención de sales de penicilina con eficacia antihistáminica y antiserotonínica.
1962. 24-X	280.470	Procedimiento de obtención de sales de penicilina con eficacia antihistáminica y antiserotonínica.
Laboratorios del Dr. Esteve S.A. [Barcelona]		
1954. 23-I	213.291	Procedimiento para preparar la N-N'-dibenciletileno diamina dipenicilina G.
Laboratorios Atral L^{tda} [Lisboa, Portugal] / Laboratorios del Dr. Esteve S.A. [Barcelona]		
1954. 11-IX	217.456	Procedimiento para preparar derivados del ácido penicilínico con actividad terapéutica.
Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A. [Barcelona]		
1956. 7-I	225.960	Procedimiento para preparar derivados del ácido penicilínico.
Sociedad Española Basipa S.A. [Barcelona]		
1956. 15-III	227.116	Procedimiento para la estabilización de los extractos crudos penicilínicos en soluciones hidroalcohólicas y/o en presencia de derivados mercuriales.

<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona]		
1963. 5-VII	289.688	Procedimiento para la obtención de una nueva penicilina.
1963. 10-VIII	291.104	Procedimiento de fabricación de una amida del ácido 6-amino penicilánico.

2.3.2. Las empresas extranjeras

2.3.2.a. Gran Bretaña

Un par de empresas británicas, *Herts Pharmaceuticals Limited* y *Roche Products Limited*, parecen ser las primeras empresas extranjeras interesadas en registrar, en septiembre de 1945, un producto con penicilina; se trata de un vendaje quirúrgico seco impregnado con una solución estéril de una sal de penicilina, envasado en un recipiente en el cual no penetre la humedad (AHOEPM, patente 170.951). No habría de tener continuidad ni esta línea ni la presencia conjunta de estas empresas en el mundo hispano de las penicilinas.

Tras este intento pionero, será *Glaxo Laboratories Limited* quien monopolice la presencia británica en el registro español de penicilinas; entre enero de 1947 y abril de 1948 presentan tres procedimientos, todos muy similares, destinados a preparar sales de penicilina en gran estado de pureza, basados en la conversión de la penicilina en una sal de una o más bases orgánicas primarias (AHOEPM, patentes 176.397; 176.753; 183.316); en 1953 se decantará por procedimientos destinados a la fabricación de ésteres y amidas de penicilina, con especial relevancia para tratamientos pulmonares (AHOEPM, patente 208.018), la producción de penicilinas biosintéticas utilizando tiosulfatos (AHOEPM, patente 208.132) y de N-bencil-beta-fenil-etil-amina, ésta capaz de producir mayor permanencia de penicilina en sangre que la procaína-penicilina (AHOEPM, patente 211.030).

El espacio dejado por la británica *Glaxo Laboratories Limited* será ocupado, en la segunda mitad de la década de 1950, por *Imperial Chemical Industries Limited* quien, en 1957, registrará un par de procedimientos relacionados con el aislamiento de fenoximetil-penicilinas (penicilina V) (AHOEPM, patente 234.998) y la formación de derivados con amino-guanidinas (AHOEPM, patente 235.510).

A partir de 1959, tras la entrada de los primeros registros británicos de *Beecham Research Laboratories Limited*, será la empresa de Middlesex quien monopolice la presencia británica en el registro español de patentes, en lo concerniente a las penicilinas. Los procedimientos patentados se deben al grupo dirigido por John-Herbert-Charles Nayler, activo para el registro español, al menos, entre octubre de 1959 y mayo de 1963, al que, de manera ocasional se incorporan otros investigadores británicos: Frank Peter Doyle (X-1959 / VII-1962), Harry Smith (X-1959 / X-1963) y George Robert Fosker (VI-1963 / XI-1963). No fueron éstos los únicos investigadores adscritos a la empresa; los expedientes españoles conocen, también, de los trabajos del británico Maurice John Soula (VIII-1963).

En no pocas casos, las innovaciones patentadas por *Beecham Research Laboratories Limited* se deben a otros investigadores no británicos: el canadiense Ivon Gaston Perrson (X-1961) –quien por estas mismas fechas figura al servicio de la empresa estadounidense *Bristol-Myers Company* (cf. AHOEPM, patente 275.555)-, el norteamericano Lee C. Cheney (V-1960 / X-1961), los suecos Berndt Olof Harald Sjoberg y Bertil Ake Ekstrom (VII-1962 / II-1963) o los norteamericanos David A.

Jonhson y Elwin J. Richardson (III-1963); no es raro que los investigadores norteamericanos, al servicio de la empresa ‘británica’, hubieran registrado sus procedimientos bajo patente previa estadounidense, lo que prueba la ‘globalización’ de esta empresa, pese a su marchamo británico.

Como cabría esperar, las patentes de penicilinas registradas por *Beecham Research Laboratories Limited* se relacionan, y desde bien temprano, con la producción de penicilinas sintéticas, basadas en los estudios que sus investigadores realizaron sobre la estructura del ácido 6-amino-penicilánico (6-APA). La patente de los británicos George Newbolt Rolinson, Merfin Richards y Frank Ralph Batchelor, al servicio de esta empresa, en la que definen el modo de obtener ácido 6-amino-penicilánico por sistemas de degradación enzimática llega a España en enero de 1960 (AHOEPM, patente 255.210); pero ya antes, en noviembre de 1959, protegieron la producción de derivados amino-acilos de este ácido, iniciando así una larga serie de procedimientos, prolongada al menos hasta finales de 1963, con más de una quincena de patentes. Esta empresa constituye, para estos años, la máxima presencia en lo que a la invención de penicilinas en España respecta. Estas primeras innovaciones de noviembre de 1959, atienden a la formación de amino-penicilinas sintéticas (AHOEPM, patentes 252.422; 267.993; 279.025; 292.910; 293.930), una línea que permanece aún activa en noviembre de 1963; en los comienzos de la década de 1960, patentan nuevas formas de alquil-penicilinas sintéticas (AHOEPM, patentes 255.209; 258.215; 258.755; 265.959; 270.875; 278.857; 285.236; 290.518; 291.973), luego (V-1960) se interesan por las fenoxi-propil penicilinas, siguiendo los desarrollos del norteamericano Lee C. Cheney (AHOEPM, patente 258.322) y, con posterioridad (VI-1963), por las fenil-penicilinas sintéticas (AHOEPM, patente 289.148).

En diciembre de 1961 se incorpora al registro español la empresa *May and Baker Limited*, lo hará para patentar un derivado del ácido 6-amino-penicilánico: una tiadiazol-amino penicilina (AHOEPM, patente 272.772), especialmente eficaz contra las bacterias productoras de penicilinasa.

Las empresas británicas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
<i>Herts Pharmaceuticals Limited / Roche Products Limited</i> [Herfordshire]		
1945. 11-IX	170.951	Procedimiento de fabricación de apósitos para vendajes de cirugía conteniendo penicilina estable.
<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Greenford (Middlesex)]		
1947. 11-I	176.397	Un procedimiento para preparar sales de penicilina en gran estado de pureza.
1947. 10-II	176.753	Procedimiento de purificar sales de penicilina.
1948. 16-IV	183.316	Procedimiento para la preparación de sales de penicilina.
1953. 27-II	208.018	Procedimiento para la preparación de nuevos derivados de penicilina.
1953. 7-III	208.132	Procedimiento para la producción de penicilina.
1953. 26-VIII	211.030	Procedimiento para la preparación de una nueva sal de penicilina G.

Imperial Chemical Industries Limited [Londres]		
1957. 23-IV	234.998	Procedimiento de separación de sales de metal alcalino de fenoximetil-penicilina.
1957. 17-V	235.510	Procedimiento de obtención de nuevas sales de penicilina.
Beecham Research Laboratories Limited [Middlesex]		
1959. 2-X	252.422	Proceso para preparación de derivados penicilínicos.
1960. 22-I	255.209	Proceso para la preparación de penicilinas y sales atóxicas de las mismas.
1960. 22-I	255.210	Proceso para la preparación de ácido 6-amino-penicilánico
1960. 19-V	258.215	Proceso para la preparación de una fórmula de penicilina y sales atóxicas de ella derivadas.
1960. 23-V	258.322	Proceso para la preparación de ácidos de la fórmula general: y sales atóxicas de los mismos.
1960. 8-VI	258.755	Procedimiento para la preparación de nuevas penicilinas y sales atóxicas de las mismas.
1961. 22-III	265.959	Procedimientos para la preparación de nuevas penicilinas.
1961. 5-VI	267.993	Certificado de adición a la patente 252.422 [Proceso para preparación de derivados penicilínicos].
1961. 2-X	270.875	Proceso para la preparación de una fórmula de penicilina y sus sales atóxicas.
1962. 2-VII	278.857	Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas.
1962. 7-VII	279.025	Procedimiento de preparación de alfa-amino-bencil-penicilina.
1963. 18-II	285.236	Procedimiento para la preparación de penicilinas.
1963. 8-III	285.863	Procedimiento de producción de penicilinas.
1963. 18-VI	289.148	Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 1-VIII	290.518	Procedimiento para preparar alfa-amino-bencil-penicilina.
1963. 25-IX	291.973	Certificado de adición a la patente 265.959 [Procedimientos para la preparación de nuevas penicilinas].
1963. 25-X	292.910	Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas.
1963. 27-XI	293.930	Procedimiento para la preparación de penicilinas.
May and Baker Limited [Dagenham, Essex]		
1961. 7-XII	272.772	Procedimiento de preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico y sus sales atóxicas.

Las inventores vinculados a empresas británicas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Beecham Research Laboratories Limited [Middlesex, Inglaterra]		
Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, Harry SMITH		
1959. 2-X	252.422	Proceso para preparación de derivados penicilínicos
1960. 19-V	258.215	Proceso para la preparación de una fórmula de penicilina y sales atóxicas de ella derivadas.

Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER		
1960. 22-I	255.209	Proceso para la preparación de penicilinas y sales atóxicas de las mismas.
1961. 22-III	265.959	Procedimientos para la preparación de nuevas penicilinas.
1962. 2-VII	278.857	Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas.
George Newbolt ROLINSON, Merfin RICHARDS, Frank Ralph BATCHELOR.		
1960. 22-I	255.210	Proceso para la preparación de ácido 6-amino-penicilánico.
Lee C. CHENEY		
1960. 23-V	258.322	Proceso para la preparación de ácidos [penicilínicos] y sales atóxicas de los mismos.
Ivon Gaston PERRSON, Lee C. CHENEY		
1961. 2-X	270.875	Proceso para la preparación de una fórmula de penicilina y sus sales atóxicas.
Berndt Olof Harald SJOBERG, Bertil Ake EKSTROM		
1962. 7-VII	279.025	Procedimiento de preparación de alfa-amino-bencil-penicilina.
1963. 18-II	285.236	Procedimiento para la preparación de penicilinas.
David A. JONHSON, Elwin J. RICHARDSON		
1963. 8-III	285.863	Procedimiento de producción de penicilinas.
George Robert FOSKER, Jonh-Herbet-Charles NAYLER		
1963. 18-VI	289.148	Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 27-XI	293.930	Procedimiento para la preparación de penicilinas.
Maurice John SOULAL		
1963. 1-VIII	290.518	Procedimiento para preparar alfa-amino-bencil-penicilina.
Jonh-Herbet-Charles NAYLER		
1963. 25-IX	291.973	Certificado de adición a la patente 265.959 [Procedimientos para la preparación de nuevas penicilinas]
Jonh-Herbet-Charles NAYLER, Harry SMITH		
1963. 25-X	292.910	Procedimiento de preparación de nuevas penicilinas.

2.3.2.b. Estados Unidos de Norteamérica

Una de la primeras empresas extranjeras interesadas en registrar penicilinas en España fue la neoyorquina *American Cynamid Company*; en diciembre de 1945 presentó a registro un método para conformar un derivado de penicilina estable y terapéuticamente activo, disuelto en un aceite o grasa asimilable pero insoluble en agua (AHOEPM, patente 171.813); el procedimiento parece seguir la formulación desarrollada, apenas unos meses antes, en septiembre de 1944, por Monroe J. Romansky y George E Rittman⁷⁵⁵; al aumento de estabilidad se une la posibilidad de su administración por vía oral.

En noviembre de 1949, esta misma empresa, *American Cynamid Company*, patentaría un procedimiento para lograr concentraciones altas de penicilina en el

⁷⁵⁵ Monroe J. ROMANSKY, George E RITTMAN. "A method of prolonging the action of penicillin". *Science*, 100(2592): 196-198. Washington, 1944.

organismo; el método consiste en combinar una sustancia hidrófoba, monoestearato de aluminio, con una sustancia hidrófila, pectina; este sistema trata de recubrir sales cristalizadas de penicilina con una capa muy delgada de pectina, logrando que la liberación de la penicilina se produzca, a mayor concentración, un tiempo después de administrado el fármaco; además, la penicilina recubierta de pectina no marca tendencia a la aglomeración en el llenado de ampollas, cosa que sí ocurre con la penicilina potásica.

En enero de 1946 otra empresa americana, *Hoffmann-La Roche Inc.*, de Nutley (New Jersey), registró en España un procedimiento para purificar soluciones con las que obtener preparados incoloros o ligeramente coloreados, menos irritantes, menos tóxicos y más estables que los que en aquel momento se fabricaban. (AHOEPM, patente 172.377). Esta misma empresa presenta, en el verano de 1946, un método de fabricación de sales de penicilina con el que obtener una producción rápida, disminución de los gastos de explotación y conservación, uso de un equipo relativamente barato y de fácil adquisición, facilidad operativa, alto rendimiento de la sal de penicilina y gran potencia y estabilidad del producto obtenido. Tantas mejoras se logran haciendo reaccionar la penicilina, disuelta en un disolvente orgánico prácticamente anhidro, con un compuesto, también orgánico, de un metal alcalino o alcalino-térreo, en cantidades estequiométricas (AHOEPM, patente 174.340).

En febrero de 1948 *The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.* insiste en procedimientos que recuerdan la fórmula Romansky y Rittmann; su propuesta es una composición farmacéutica estable, formada por calcio-penicilina, en un vehículo anhidro de cera y aceite de cacahuete muy refinado (AHOEPM, patentes 182.483; 182.707).

Mayor novedad supone el registro, en octubre de 1948, de las formulaciones de sales de procaína con penicilina, propiciada por *Bristol Laboratories Inc.* (AHOEPM, patente 185.490), la misma empresa se interesará, meses después, por la valoración del tamaño de las partículas de penicilina como elemento capaz de propiciar una prolongación del nivel terapéutico de penicilina en sangre (AHOEPM, patente 187.163) y, en 1951, por proteger los avances en la estabilización de las mezclas de procaína-penicilina, desarrollados por Frank Harold Buckwalter, al incorporar un agente de suspensión (AHOEPM, patentes 198.106; 200.134); en noviembre de 1953, protegen la formación de una nueva sal de amina de penicilina (AHOEPM, patente 212.261) y, ya en 1955, la incorporación de fitinatos, a las sales acuosolubles de penicilina, para conseguir un estado de dispersión completa y uniforme de estas suspensiones, incluso después de un almacenaje prolongado (AHOEPM, patente 224.139). A partir de la primavera de 1962, esta empresa americana volverá a interesarse en el registro español de patentes, entonces bajo la denominación de *Bristol-Myers Company*.

De marzo de 1949 datan los primeros registros españoles de *Merck & Co. Inc.* relacionados con las penicilinas; se trata de métodos de purificación en los que intervienen aminas alquílicas (AHOEPM, patentes 187.312; 187.313), de producción de penicilina en condiciones sumergidas (AHOEPM, patente 187.371) y de utilización de 'tipos mejorados de hongos' (AHOEPM, patente 187.378); sin duda los mejores procedimientos de los que disponía esta importante empresa en el ámbito industrial de las penicilinas. Ya más tardía, de 1951, es una patente relacionada con el tamaño de los cristales que han de presentar las combinaciones de procaína-penicilina (AHOEPM, patente 197.156). En abril de 1961 registró un procedimiento para fabricar un derivado sintético de fluoro-penicilina, consiste en poner en contacto ácido 6-amino-penicilánico con un agente acilante: alfa-fluoro-fenilacetilo (AHOEPM, patente 266.718).

En octubre de 1949 comienza a registrar sus métodos penicilínicos en España *Schenley Industries Inc.*; sus primeras propuestas se refieren a la preparación de sales alcalinas puras de penicilina, partiendo de sales de bases orgánicas de penicilina (AHOEPM, patente 190.142; 190.143); luego, en marzo de 1951, abordará la producción de sales estériles de metal alcalino de penicilina a partir de penicilinas procaínicas no estériles (AHOEPM, patente 224.622); y, en mayo de 1958, protegerá un procedimiento para la producción de preparaciones de penicilinas libres de pirógenos (AHOEPM, patente 241.768).

De marzo de 1951 datan los registros iniciales, sobre penicilinas, de *Eli Lilly and Company*, corresponden a la obtención de un derivado procaínico de penicilina (AHOEPM, patente 196.992). En agosto de 1961 presentará un procedimiento para fabricar fenoxi-propil penicilinas, derivados sintéticos del ácido 6-amino-penicilánico (AHOEPM, patente 269.787).

En mayo de 1951 *Comercial Solvents Corporation* registrará un método con el que producir sales de penicilina de N-metil-(2-hidroxi-1,2-difenil-etil)-amina, una sal estable, de baja toxicidad y capaz de mantener prolongados niveles terapéuticos de penicilina en sangre, tanto si se administra por vía oral como inyectable (AHOEPM, patente 198.008).

También con ánimo de producir nuevas penicilinas biosintéticas, en julio de 1951 la empresa *Wyeth Inc.* registro en España un procedimiento para preparar sales de penicilina amino-alquileo-diamínicas, virtualmente insolubles en agua (AHOEPM, patente 198.789). Apenas unos años después, en noviembre de 1954, el *holding* al que esta empresa pertenecía, *American Home Products Corporation*, protegerá las invenciones desarrolladas por Joseph Lester Szabo y William F. Bruce relativas a un procedimiento simplificado para obtener sales de penicilina con ciertas alcoholen-diaminas sustituidas, terapéuticamente activas y prácticamente insolubles en agua (AHOEPM, patente 218.678). Años más tarde, en mayo de 1964, se interesará por proteger el método de producir unas penicilinas sintéticas, de administración oral, derivadas de bencil-penicilina: acetoxi-metil-bencil-penicilinato (AHOEPM, patente 300.394).

Avanzado septiembre de 1960, *Chas, Pfizer & Co. Inc.* registra un método para producir alcohol-penicilinas alfa-sustituidas, unas penicilinas sintéticas, derivadas del ácido 6-amino-penicilánico, útiles por vía parenteral, pero especialmente activas por vía oral (AHOEPM, patente 261.318); y, pocos días después, unas fenil-penicilinas de similar utilidad (AHOEPM, patente 261.390).

En marzo de 1962 *Bristol-Myers Company* presenta ante el registro español un procedimiento para preparar alfa-amino-bencil-penicilinas (AHOEPM, patente 275.555); un tipo de preparados muy similares a los que, apenas unos meses antes, registrara la empresa británica *Beecham Research Laboratories Limited* (AHOEPM, patente 270.875); no en vano, como responsables de ambos procedimientos figura el canadiense Ivon Gaston Perrson, acompañado aquí por William F. Minor; pocos meses más tarde, entre enero y abril de 1963, la empresa presentaría un grupo de cuatro patentes similares (AHOEPM, patentes 284.254; 287.497; 287.498; 287.499), la primera firmada por el americano David A. Johnson y el canadiense Saul Wolf; la segunda y la tercera con las firmas del canadiense Ivon Gaston Perrson y de los norteamericanos Lee C. Cheney y John C. Godfrey y, la última de ellas, avalada sólo por la firma de los dos estadounidenses; lo que parece representar un grupo de trabajo canadiense-estadounidense claramente delimitado y nos permite vislumbrar una cierta

conexión entre la empresa norte-americana *Bristol-Myers Company* y la británica *Beecham Research Laboratories Limited*.

En agosto de 1962, bajo la propiedad de *Bristol-Myers Company* y con la autorización del canadiense Saul Wolfe, se registró un procedimiento para fabricar anhidro-penicilinas, preparados que pueden convertirse en compuestos con el núcleo de la cefalosporina C (AHOEPM, patente 280.079).

Las empresas norteamericanas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
<i>American Cynamid Company</i> [Nueva York]		
1945. 11-XII	171.813	Un procedimiento de preparar una composición terapéutica con penicilina.
1949. 18-XI	190.471	Método de producir una composición de penicilina revestida.
<i>Hoffmann-La Roche Inc.</i> [Nutley (New Jersey)]		
1946. 30-I	172.377	Procedimiento de preparar penicilina purificada.
1946. 17-VII	174.340	Un procedimiento de preparar sales de penicilina de metales alcalinos y alcalino-térreos.
<i>The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.</i> [Baltimore (Maryland)]		
1948. 19-II	182.483	Procedimiento para la obtención de preparaciones para la terapéutica con penicilina.
1948. 2-III	182.707	Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal número 182.483 [Procedimiento para la obtención de preparaciones para la terapéutica con penicilina].
<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [Syracuse (Nueva York)]		
1948. 7-X	185.490	Método de producción de una sal de procaína de penicilina.
1949. 22-II	187.163	Método de preparar un producto inyectable de penicilina.
1951. 31-V	198.106	Procedimiento para obtener una suspensión acuosa de penicilina-procaína G.
1951. 25-X	200.134	Certificado de adición a la patente 198.106 [Procedimiento para obtener una suspensión acuosa de penicilina-procaína G].
1953. 19-XI	212.261	Un método para preparar sales de penicilina.
1955. 24-IX	224.139	Procedimiento para mejorar la facilidad de nueva suspensión de suspensiones acuosas de penicilina.
<i>Bristol-Myers Company</i> [Nueva York]		
1962. 16-III	275.555	Procedimiento de preparación de amino-penicilinas sustituidas o no sustituidas.
1962. 16-VIII	280.079	Procedimiento de fabricación de una anhidro-penicilina.
1963. 17-I	284.254	Un procedimiento para la producción de una alfa-amino-bencil-penicilina.
1963. 27-IV	287.497	Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 27-IV	287.498	Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 27-IV	287.499	Proceso de preparación de penicilinas.

Merck & Co. Inc. [Rahway (Nueva Jersey)]		
1949. 4-III	187.312	Procedimiento para el aislamiento y purificación de penicilina G.
1949. 4-III	187.313	Procedimiento de fabricar sales de penicilina G.
1949. 8-III	187.371	Procedimiento para la producción de penicilina.
1949. 9-III	187.378	Procedimiento para la producción de penicilina.
1951. 27-III	197.156	Procedimiento de preparar cristales de procaina-penicilina.
1961. 13-IV	266.718	Método de producir alcoholpenicilina-alfa-sustituidas.
Schenley Industries Inc. [Nueva York]		
1949. 22-X	190.142	Método para producir sales alcalinas de penicilina.
1949. 22-X	190.143	Un método para la producción de penicilina sódica.
1955. 24-X	224.622	Procedimiento para la producción de una sal estéril de metal de una penicilina.
1958. 7-V	241.768	Procedimiento para la producción de penicilinas exenta de pirógenos.
Eli Lilly and Company [Indianápolis (Indiana)]		
1951. 13-III	196.992	Procedimiento de obtención de sales insolubles de penicilina.
1961. 11-VIII	269.787	Procedimiento para la preparación de una nueva sustancia de penicilina.
Comercial Solvents Corporation [City of Terre Haute (Indiana)]		
1951. 23-V	198.008	Procedimiento de preparar sal de penicilina.
Wyeth Inc. [Filadelfia (Pensilvania)]		
1951. 13-VII	198.789	Procedimiento de preparar sales de penicilina insolubles en agua.
American Home Products Corporation [Nueva York]		
1954. 26-XI	218.678	Procedimiento para separar penicilina.
Chas. Pfizer & Co. Inc. [Nueva York]		
1960. 27-IX	261.318	Método para producir alcohol-penicilinas alfa-sustituidas.
1960. 30-IX	261.390	Procedimiento de preparar ácidos penicilánicos.

Los inventores vinculados a empresas norteamericanas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Bristol Laboratories Inc. [Syracuse (Nueva York)]		
Frank Harold BUCKWALTER		
1951. 31-V	198.106	Procedimiento para obtener una suspensión acuosa de penicilina-procaína G.
1951. 25-X	200.134	Certificado de adición a la patente 198.106 [Procedimiento para obtener una suspensión acuosa de penicilina-procaína G].
American Home Products Corporation [Wyeth Inc.]. [Nueva York]		
Joseph Lester SZABO, William F. BRUCE		
1954. 26-XI	218.678	Un procedimiento de separar penicilina.

Bristol-Myers Company [Nueva York]		
Yvon Gaston PERRSON, William F. MINOR		
1962. 16-III	275.555	Procedimiento de preparación de amino-penicilina sustituidas o no sustituidas.
Saul WOLFE		
1962. 16-VIII	280.079	Procedimiento de fabricación de una anhidro-penicilina.
David A. JOHNSON, Saul WOLF		
1963. 17-I	284.254	Un procedimiento para la producción de una alfa-amino-bencil-penicilina.
Yvon Gaston PERRSON, Lee C. CHENEY, John C. GODFREY		
1963. 27-IV	287.497	Procedimiento de preparación de penicilinas.
1963. 27-IV	287.498	Procedimiento de preparación de penicilinas.
Lee C. CHENEY, John C. GODFREY		
1963. 27-IV	287.499	Proceso de preparación de penicilinas.

2.3.2.c. Francia

Una de las primeras industrias francesas interesadas en registrar, en España, sus avances sobre penicilinas fue la parisina *Carbonisation et Charbons Actifs* S.A.; en febrero de 1946 presentó el procedimiento desarrollado por Broch, Kreharo, Netick y Pangier, que afecta a la calidad de los medios de cultivo utilizados en la fabricación de penicilina; como cabría esperar, alude a una disminución de los contaminantes del medio si, previamente, se trata con carbones activos decolorantes, especialmente carbones activados por vapor de agua, lógicamente su especialidad (AHOEPM, patente 172.503).

La *Société des Usines Chimiques Rhone Poulenc* se centró, en su registro de enero de 1949, en una nueva composición del disolvente que habría de utilizarse para preparar la penicilina comercial, optando por una solución tamponada a un pH comprendido entre 6,5 y 8,5, con lo que aumentaba la estabilidad final del preparado y se facilitaba su conservación (AHOEPM, patente 186.709). Una quincena de años después, en julio de 1961, volvería a interesarse por las penicilinas, en esta ocasión para patentar en nuestro país un procedimiento industrial con el que obtener ácido 6-amino-penicilánico a partir de los mostos de fermentación que suelen contenerle (AHOEPM, patente 269.080).

En la primavera de 1950 *Les Laboratoires Français de Chimotherapie* protegieron, en España, un procedimiento para preparar, de manera extemporánea, soluciones de penicilina con quinina, poco solubles en agua y con un considerable efecto prolongado de la actividad antibacteriana en sangre (AHOEPM, patente 192.353); un procedimiento levemente modificado fue registrado en marzo de 1952 (AHOEPM, patente 202.360). En febrero de 1956 mostrará, de nuevo, su interés por conseguir penicilinas de ‘efecto retardado’, ahora mediante la biosíntesis de penicilinas con 2,5-difenil-piperazina (AHOEPM, patente 226.495).

Más compleja es la propuesta que, en marzo de 1960, realiza la parisina *Société d’Etudes de Recerches et d’Applications Scientifiques et Medicinales* (ERASM), se trata de un procedimiento para la fabricación de un nuevo antibiótico relacionado con las

series de las tetraciclinas y las penicilinas, bastante soluble en agua y prácticamente insensible a la penicilinasasa (AHOEPM, patente 256.969).

En julio de 1963, *Roussel-Uclaf* S.A. registra un procedimiento de fabricación de bencil-oxi-penicilinas, elaboradas por combinación con ácido 6-amino-penicilánico (AHOEPM, patente 290.113).

Las empresas francesas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
<i>Carbonisation et Charbons Actifs</i> S.A. [París]		
1946. 8-II	172.503	Perfeccionamientos introducidos en la fabricación de la penicilina y otros productos antibióticos.
<i>Société des Usines Chimiques Rhone Poulenc</i> [París]		
1949. 21-I	186.709	Procedimiento para la obtención de penicilina estable.
1961. 12-VII	269.080	Procedimiento para la obtención de nuevos derivados del ácido amino-6penicilánico [sic, por 6-amino-penicilánico].
<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [París]		
1950. 30-III	192.353	Procedimiento de preparación de soluciones de penicilina de efecto prolongado.
1952. 7-III	202.360	Certificado de adición a la patente 192.353 [Procedimiento de preparación de soluciones de penicilina de efecto prolongado].
1956. 3-II	226.495	Procedimiento para la obtención de sales de penicilina de la 2,5 difenil-piperazina
<i>Société d'Etudes de Recherches et d'Applications Scientifiques et Medicinales</i> (ERASM) [París]		
1960. 30-III	256.969	Procedimiento para la obtención de fenoxi-metil-penicilinato de N ² -[ó 9, ó 7]-4-(beta-hidroxi-etil-dietil-diamino-metil-tetraciclina de acción antibiótica.
<i>Roussel-Uclaf</i> S.A. [París]		
1963. 19-VII	290.113	Procedimiento de preparación de un derivado de penicilina.

Los inventores vinculados a empresas francesas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
<i>Carbonisation et Charbons Actifs</i> S.A. [París]		
BROCH, KREHARO, NETICK, PANGIER.		
1946. 8-II	172.503	Procedimiento para la fabricación de penicilinas.

2.3.2.d. Dinamarca

En el verano de 1948 la danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presenta, ante la Administración española, el primero de una larga serie de expedientes de patentes relacionadas con penicilinas; su propuesta se refiere a una combinación de procaína y penicilina (AHOEPM, patente 184.612); sigue a ésta un sistema para purificar las sales de penicilina, mediante la adición de un alcoholato, en un disolvente

orgánico y en ausencia total de agua (AHOEPM, patente 184.673); sobre el que presentarán algunas modificaciones en febrero de 1949 (AHOEPM, patente 187.178).

En octubre de 1948 la *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* seguirá mostrando su interés por obtener sales sódicas o cálcicas de penicilina, en este caso mediante transformación de sus sales potásicas (AHOEPM, patente 185.882); en mayo de 1949 se ocupará de lograr estas mismas sales mediante permutación iónica, partiendo también de sales potásicas o amónicas (AHOEPM, patente 188.260), de producir nuevas sales de penicilina utilizando como precursores derivados del ácido fenacetúrico (AHOEPM, patente 188.073) y de precipitar penicilina mediante la adición de piridinas (AHOEPM, patente 188.188).

De la primavera de 1950 data una patente de la *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* destinada a obtener nuevas sales de penicilina de efecto prolongado, provocando reacciones con sustancias que presentan grupos alcoholos (AHOEPM, patente 192.462); en junio de este año se interesa por los sistemas de regulación del tamaño de los cristales de procaína-penicilina (AHOEPM, patente 193.361) y por un nuevo método de fabricar sales insolubles de procaína-penicilina (AHOEPM, patente 193.494); en julio de 1950 propone uno de los primeros sistemas industriales de producir amino-ésteres de penicilina (AHOEPM, patente 193.814) y, en septiembre de éste 1951, retoma los esteratos de penicilina para lograr un efecto prolongado de la acción de la penicilina al tratarlos con sales básicas de aluminio (AHOEPM, patente 199.562).

Entre mayo de 1953 y agosto de 1957 se presentan a registro, por parte de la *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, un buen número de patentes, en gran parte debidas a las investigaciones de Erling Juhl Nielsen, a veces (1953) realizadas en colaboración con Wang Ole Godtfredsen. Los primeros trabajos, de mayo de 1953, siguen la línea ya conocida de producir ésteres de penicilina, en esta ocasión con alcoholes que poseen un grupo secundario de aminas y sales de estos ésteres; como otras producciones anteriores de la empresa, éstos presentan la especificidad de acumularse en los tejidos pulmonares (AHOEPM, patentes 209.522; 213.519; 217.052). En 1956 sus procedimientos giran en torno a la producción de los derivados fenoximetílicos (penicilina V), particularmente sus sales cálcicas, de baja solubilidad, con las que es posible obtener efectos penicilínicos prolongados (AHOEPM, patentes 231.298; 232.214; 232.323) y, en el verano de 1957, se ocupa de un método para la purificación de fenoxi-metil-penicilina (AHOEPM, patente 237.344).

Desde el verano de 1960, la *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* se preocupa por registrar, en España, nuevos métodos de fabricar penicilinas sintéticas mediante la acilación del ácido 6-amino-penicilánico con ácidos amino-carboxílicos (AHOEPM, patentes 259.767; 260.157), bien mediante procesos que permiten elaborar penicilinas resistentes a penicilinasas (AHOEPM, patente 261.363), bien mediante la producción de metil-penicilinas (AHOEPM, patente 267.685), ésta última desarrollada por el investigador danés Erling Knud Frederiksen y el sueco Ernst Richard Frank y cuya primera protección se solicitó ante la Administración británica.

Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted fue, con mucho, la empresa danesa que más interés mostró por proteger sus procedimientos ante el registro español de patentes, pero no fue la única: *Rudolf Carl Reiter*, instalado en Copenhague, presentó, en marzo de 1953, un procedimiento para purificar penicilinas a través de la producción de sales diamínicas de éstas (AHOEPM, patente 208.539). Y *Novo Therapeutisk Laboratorium A/S* registró, en 1959, un par de procedimientos para purificar los derivados fenoxi-

metilicos de la penicilina (penicilina V) (AHOEPM, patente 246.912) y preparar sus sales potásicas (AHOEPM, patente 248.442); en diciembre de 1961 registró un procedimiento para la formulación de derivados n-acilo del ácido 6-amino-penicilánico, mediante un método en el cual se hace reaccionar una solución en disolvente orgánico de una sal de amonio cuaternario del ácido 6-amino-penicilánico, con un agente de acilación (AHOEPM, patente 273.089), un procedimiento cuya primacía se obtuvo ante la Administración británica, pese al domicilio danés de la empresa, lo cual, según parece, no fue una excepción.

Las empresas danesas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Copenhague / Ballerup]		
1948. 17-VII	184.612	Método de producir una sal de penicilina.
1948. 22-VII	184.673	Método de recuperar una sal purificada de penicilina.
1948. 11-XI	185.882	Procedimiento de producir la sal sódica o cálcica de penicilina en forma -o no- de solución, partiendo de la sal potásica de la penicilina.
1949. 23-II	187.178	Certificado de adición a la patente 184.673 [Método de recuperar una sal purificada de penicilina].
1949. 4-V	188.073	Procedimiento de producir penicilina.
1949. 12-V	188.188	Un procedimiento para producir penicilinas.
1949. 18-V	188.260	Método para producir sales de penicilina.
1950. 8-IV	192.462	Método para la producción de una sal de penicilina con efecto prolongado.
1950. 10-VI	193.361	Un procedimiento de preparar precipitados cristalinos de una combinación difícilmente soluble, adecuada para inyecciones de penicilina, y bases orgánicas especialmente la llamada procaina-penicilina.
1950. 19-VI	193.494	Un método de producir una sal difícilmente soluble de bencil-penicilina con bases orgánicas, especialmente procaina.
1950. 6-VII	193.814	Método para la producción de amino-ésteres de penicilina.
1951. 12-IX	199.562	Método para la producción de preparados de penicilina.
1953. 27-V	209.522	Procedimiento para la preparación de ésteres de penicilina.
1954. 6-II	213.519	Método de producir sales de ésteres de penicilina poco solubles en agua.
1954. 19-VIII	217.052	Método para la producción de mono o di-ésteres de penicilina.
1956. 11-X	231.298	Método de fabricación de una sal cristalina de una fenoximetil-penicilina.
1956. 29-XI	232.214	Certificado de adición a la patente 231.298 [Método de una sal cristalina de la fenoximetil-penicilina].
1956. 6-XII	232.323	Certificado de adición a la patente 231.298 [Método de una sal cristalina de la fenoximetil-penicilina].
1957. 29-VIII	237.344	Método de purificación de fenoximetil-penicilina.
1960. 20-VII	259.767	Método para la producción de penicilinas.

1960. 4-VIII	260.157	Método para la producción de penicilinas.
1960. 29-IX	261.363	Método para la producción de penicilinas.
1961. 25-V	267.685	Método para a la producción de derivados de penicilinas.
Rudolf Carl Reiter [Copenhague]		
1953. 28-III	208.539	Procedimiento para producir sales de penicilina partiendo de sales impuras de penicilina con aminas.
Novo Therapeutisk Laboratorium A/S [Copenhague]		
1959. 29-I	246.912	Un procedimiento de purificar penicilina V.
1959. 4-IV	248.442	Procedimiento para preparar la sal potásica de penicilina V y G.
1961. 20-XII	273.089	Procedimiento para la preparación de derivados n-acilo del ácido 6-amino-penicilánico.

Los inventores vinculados a empresas danesas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted [Copenhague, Dinamarca]		
Wang Ole GODTFREDSEN, Erling Juhl NIELSEN		
1953. 27-V	209.522	Un procedimiento para la preparación de ésteres de penicilina.
Erling Juhl NIELSEN		
1954. 6-II	213.519	Un método de producir sales de ésteres de penicilina poco solubles en agua.
1956. 11-X	231.298	Método de fabricación de una sal cristalina de una fenoximetil-penicilina.
1956. 29-XI	232.214	Certificado de adición a la patente 231.298 [Método de una sal cristalina de la fenoximetil-penicilina].
1956. 6-XII	232.323	Certificado de adición a la patente 231.298 [Método de una sal cristalina de la fenoximetil-penicilina].
1957. 29-VIII	237.344	Método de purificación de fenoximetil-penicilina.
Erling Knud FREDERIKSEN, Ernst Richard FRANK		
1961. 25-V	267.685	Método para a la producción de derivados de penicilinas

2.3.2.e. Suecia

Sólo una empresa sueca parece interesarse por los procesos relacionados con la fabricación de penicilinas; se trata de Aktiebolaget *Kabi* quien, en mayo de 1951, introduce un procedimiento relacionado con la estabilidad de las soluciones acuosas de penicilina-procaína, favorecida por la incorporación de un hidruro de procaína (AHOEPM, patente 197.713).

Las empresas suecas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Aktiebolaget Kabi [Estocolmo]		
1951. 4-V	197.713	Procedimiento de producir preparados de sales de penicilina.

2.3.2.f. Alemania

No son muchas las empresas alemanas interesadas por el mercado español de penicilinas, al menos en lo que a su presencia en el registro de patentes respecta. En 1951, la *Gewerkschaft Rheinpreussen* presenta una nueva forma de obtención de sales procaína-penicilínicas, por medio de la reacción de procaína clorhídrica con una sal sódica de una penicilina (AHOEPM, patente 200.204).

En el verano de 1953, la empresa *Chemie Grünenthal* Gesellschaft m.b.H. registra un par de procedimientos; el primero de ellos destinado a la fabricación de ésteres de la serie penicilínica con efecto hepático (AHOEPM, patente 210.782); el segundo, dedicado a la obtención de un compuesto de penicilina con efecto antihistamínico, logrado mediante su reacción con compuestos de bencimidazol (AHOEPM, patente 210.907).

Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft presentó, en febrero de 1956, un sistema para producir nuevas sales de penicilinas con efecto retardado, en este caso mediante la asociación con tetra-hidro-isoquinolinas (AHOEPM, patente 226.921); en abril y septiembre de 1962 se interesó por proteger sistemas de obtención de ácido 6-amino-penicilánico mediante procesos que estimulaban el crecimiento de bacterias sobre penicilinas (AHOEPM, patentes 257.220; 260.626; 280.828); en agosto de 1960 registró un procedimiento con el que cultivar bacterias en las que la actividad disociadora de las enzimas penicilíticas se viera activada (AHOEPM, patente 260.287) y, en noviembre de 1960, un método para fabricar un derivado del ácido 6-amino-penicilánico: una acil-amino-penicilina (AHOEPM, patente 262.353).

A *Farbwerke Hoechst* Aktiengesellschaft (*Meister Lucius & Brüning*) se debe el registro, en febrero de 1953, de preparados de penicilina para suspensiones fluidas, preferentemente de procaína-penicilina, sometidas a desecación por congelación con un contenido de propiedades antigénicas (AHOEPM, patente 210.533), desarrollado por Heinz Oepfinger, Dietmar Gericke y Ludwig Schornig; en abril de 1962 registró un nuevo procedimiento para la obtención de una sal de penicilina V de baja solubilidad en agua y jugo gástrico y mayor solubilidad en jugo intestinal (AHOEPM, patente 276.130).

Por último, anotar la presencia de la empresa del *Dr. Karl Thomae* G.M.B.H. quien, en octubre de 1963, presentó a registro una patente destinada a proteger un procedimiento de síntesis de indoil penicilinas, derivadas del ácido 6-amino-penicilánico (AHOEPM, patente 292.923).

Las empresas alemanas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
<i>Gewerkschaft Rheinpreussen</i> [Homburg / Niederrhein]		
1951. 29-X	200.204	Procedimiento de preparación de soluciones de penicilina difícilmente solubles cristalizadas u oleosas.
<i>Chemie Grünenthal</i> Gesellschaft m.b.H. [Stolberg im Rheinland]		
1953. 7-VIII	210.782	Procedimiento de fabricación de nuevos ésteres de la serie penicilínica.

1953. 19-VIII	210.907	Procedimiento para la obtención de un compuesto de penicilina-antihistamina.
Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft [Leverkusen-Bayerwerk]		
1956. 25-II	226.921	Procedimiento para la obtención de sales de penicilina.
1960. 7-IV	257.220	Procedimiento para la obtención de ácido 6-amino-penicilánico
1960. 10-VIII	260.287	Procedimiento para la obtención de preparados encínicos [<i>sic</i> por enzimáticos] disociadores de penicilina.
1960. 27-VIII	260.626	Procedimiento para la acilación enzimática de ácido 6-amino-penicilánico.
1960. 11-XI	262.353	Procedimiento para la obtención de ácidos 6-acilamino-penicilánicos.
1962. 10-IX	280.828	Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 260.626, concedida en 14 de septiembre de 1.960, por 'Procedimiento para la acilación enzimática de ácido 6-amino-penicilánico'
Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft (Meister Lucius & Brüning) [Frankfurt (M)-Hoechts]		
1953. 22-VII	210.533	Procedimiento para la obtención de preparados de penicilina secados por congelación.
1962. 3-IV	276.130	Procedimiento para la obtención de una sal de penicilina V adecuada para la administración bucal.
Dr. Karl Thomae G.M.B.H. [Riberach an der Riss]		
1963. 26-X	292.923	Procedimiento para la obtención de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico.

Los inventores vinculados a empresas alemanas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft (Meister Lucius & Brüning) [Frankfurt (M)-Hoechts]		
Heinz OEPFINGER, Dietmar GERICHKE, Ludwig SCHORNIG.		
1953. 22-VII	210.533	Procedimiento para la obtención de preparados de penicilina secados por congelación.

2.3.2.g. Austria

Sólo una empresa de procedencia austriaca parece interesarse por proteger, en España, sus invenciones relacionadas con las penicilinas; se trata de la tirolesa *Biochemie Gesellschaft* m.b.H. En marzo de 1953 registró los desarrollos debidos a Ernst Brandl y Hans Margreiter para obtener penicilinas estables, adecuadas para la terapia oral; se trata de unos tempranos derivados fenoxi-metílicos [penicilina V] (AHOEPM, patente 208.204). En noviembre de 1960 recoge, de nuevo, los trabajos de Ernst Brandl y Hans Margreiter, esta vez en colaboración con Richard Brunner, centrados en conseguir un procedimiento de fermentación en el que, con la adición de uno o varios precursores, pueden obtenerse penicilinas con un rendimiento mejorado (AHOEPM, patente 262.685).

Las empresas austriacas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Biochemie Gesellschaft m.b.H. [Innsbruck (Tirol)]		
1953. 12-III	208.204	Procedimiento para la obtención de penicilinas estables adecuadas especialmente para la terapia oral.
1960. 23-XI	262.685	Procedimiento para la fabricación de penicilinas.

Los inventores vinculados a empresas austriacas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Biochemie Gesellschaft m.b.H. [Innsbruck (Tirol)]		
Ernst BRANDL, Hans MARGREITER		
1953. 12-III	208.204	Procedimiento para la obtención de penicilinas estables, adecuadas especialmente para la terapia oral
Hans MARGREITER, Richard BRUNNER, Ernst BRANDL.		
1960. 23-XI	262.685	Procedimiento para la fabricación de penicilinas

2.3.2.h. Italia

En mayo de 1955, una empresa milanesa, *Farmaceutici Italia* S.A., presentó en el registro español un par de patentes, ambas relacionadas con la obtención de un vehículo reactivo para la preparación extemporánea de suspensiones de penicilina (AHOEPM, patentes 221.679; 221.746).

La romana *Leo Industrie Chimique Farmaceutiche* registra, en julio de 1956 y en septiembre de 1959, sendos procedimientos para la preparación de sales de penicilina con compuestos sulfamidados; la asociación de estos productos hacía presumible que se presentarían los efectos terapéuticos de cada uno de los componentes y lograr así un efecto sinérgico (AHOEPM, patentes 229.788; 251.912).

En septiembre de 1962 la empresa milanesa *Lepetit*, S.p.A. protege, ante la Administración española, un par de patentes que ya tenían registro ante las autoridades británicas; se trata de procedimientos para fabricar penicilinas sintéticas, derivados del ácido 6 amino-penicilánico (6-APA): uno de ellos al hacerlo reaccionar con un aminoácido suspendido en un disolvente orgánico anhidro o inerte (AHOEPM, patente 280.753), el otro con un producto con grupo alquileo incorporado (AHOEPM, patente 280.754). De nuevo, como ocurría con algunas empresas danesas y francesas, se prima el registro ante las autoridades británicas que ante la propia Administración nacional.

Las empresas italianas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Farmaceutici Italia S.A. [Milán]		
1955. 4-V	221.679	Procedimiento para la obtención de un vehículo reactivo para la preparación extemporánea de suspensiones de penicilina que presentan actividad inmediata y persistente, o solo persistente.

1955. 7-V	221.746	Procedimiento para la obtención de un vehículo reactivo para la preparación extemporánea de suspensiones de penicilina que presentan una acción inmediata, retardada y persistente o solamente retardada y persistente.
Leo Industrie Chimique Farmaceutiche [Roma]		
1956. 12-VII	229.788	Un procedimiento para la preparación de sales de penicilina con compuestos sulfamidados.
1959. 5-IX	251.912	Procedimiento para la preparación de un compuesto de diferentes penicilinas con un compuesto de naturaleza sulfamídica.
Lepetit, S.p.A. [Milán]		
1962. 13-IX	280.753	Procedimiento de preparación de penicilina.
1962. 13-IX	280.754	Procedimiento de preparación de penicilina.

2.3.2.i. Argentina

En junio de 1955, un empresario argentino, Sebastián Bagó Basagañas, de origen hispano y profesionalmente vinculado en sus inicios a los *Laboratorios Cusi*, presenta ante el registro español de patentes un par de procedimientos, relacionados ambos con la producción de nuevas sales de penicilina combinadas con alquilen-diaminas, caracterizadas por su estabilidad y acción prolongada (AHOEPM, patentes 222.304; 231.233).

Las empresas argentinas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
Sebastián Bagó Basagañas [Buenos Aires]		
1955. 8-VI	222.304	Procedimiento para preparar dipenicilinato de N,N-bis (naftilmetil) etilendiaminas.
1956. 9-X	231.233	Procedimiento de dipenicilinato de dibencil-etilén-diamina.

2.3.2.j. Noruega

En los últimos meses de 1956 es una empresa noruega, A/S *Apothekernes Laboratorium for special-preparater* quien registra, en España, un par de procedimientos relacionados con penicilinas; el primero, en octubre de éste 1956, relativo a un nuevo método para preparar sales de penicilina de dibencil-etilén-diamina, con marcadas ventajas económicas (AHOEPM, patente 231.221). También guiados por la economía del procedimiento, en diciembre de 1956 esta misma empresa registra un proceso de depuración especial de penicilinas que permite obtener, con rendimiento prácticamente cuantitativo, soluciones muy puras de ácidos penicilínicos libres en disolventes orgánicos (AHOEPM, patente 232.307).

Las empresas noruegas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
A/S <i>Apothekernes Laboratorium for special-preparater</i> [Oslo]		
1956. 8-X	231.221	Procedimiento para la preparación de sales de penicilina de dibenciletileno diamina.
1956. 5-XII	232.307	Procedimiento para la obtención de ácidos penicilínicos libres.

2.3.2.k. Suiza

En los primeros meses de 1963 una empresa suiza, *J. R Geigy A.G.* comienza a registrar, en España, sus patentes relacionadas con las penicilinas; a la zaga de otras empresas alemanas y danesas del sector, se interesa por los procesos de fabricación de acil-amino-penicilinas derivadas del ácido 6-amino-penicilánico, sobre las que presenta un par de procedimientos (AHOEPM, patente 284.536; 285.853).

Las empresas suizas con patentes de penicilinas registradas en España (1945-1963)		
<i>J. R Geigy A.G.</i> [Basilea]		
1963. 25-I	284.536	Procedimiento para la preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico.
1963. 8-III	285.853	Procedimiento para la preparación de nuevos derivados del ácido 6-amino-penicilánico.

2.3.3. La tramitación de las solicitudes de patentes: tiempo y publicidad

2.3.3.a. Expedientes extranjeros ante la Administración española

Como vemos, la mayor parte de las patentes registradas en España sobre penicilinas, durante los años abordados en este estudio, corresponden a empresas extranjeras, un total de 125 expedientes de los 155 analizados, que suponen un 80,6%. Los solicitantes extranjeros acostumbran a registrar originalmente su patente en el país de origen de la empresa; pero no siempre fue así: la danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presenta registros previamente patentados en Gran Bretaña (AHOEPM, patentes 213.519; 231.298; 232.214; 232.323; 259.767; 260.157; 261.363; 267.685), al igual que la francesa *Société d'Etudes de Recherches et d'Applications Scientifiques et Medicinales* (ERASM) (AHOEPM, patente 256.969), o la italiana *Lepetit S.p.A.* (AHOEPM, patentes 280.753; 280.754), lo que parece mostrar el papel hegemónico que, al menos entre las empresas europeas interesadas en las patentes de penicilinas, parece jugar la Administración británica. Y la 'británica' *Beecham Research Laboratories Limited* utiliza la información de los expedientes previamente registrados ante la Administración norteamericana (AHOEPM, patentes 270.875; 285.863), una prueba más de la interrelación entre estas empresas británicas y sus 'filiales' norteamericanas.

A éstas debe añadirse el caso particular de la española *Laboratorios del Dr. Esteve S.A.* que previamente había registrado su patente en Portugal (AHOEPM, patente 213.291), una prueba evidente de su colaboración, en estos años centrales de la década de 1950, con empresas portuguesas, en el caso que nos ocupa con los

Laboratorios Atral L^{tda} de Lisboa, con quien tiene alguna patente conjunta (AHOEPM, patente 217.456).

Aun cuando en las décadas de 1940 y 1950 resulta habitual que cada expediente presentado en el registro español de patentes se corresponda con otro ya avalado por una Administración extranjera, a partir de 1959 comienza a generalizarse el hecho, particularmente en los expedientes presentados por la empresa *Beecham Research Laboratories Limited*, de que cada expediente registrado en nuestro país esté elaborado sobre dos o más solicitudes prioritarias, lo que podría entenderse como la patente principal y las mejoras introducidas en ella.

Como norma general, el tiempo que transcurre entre la protección presentada en cualquier país extranjero y su formulación en el nuestro ronda los doce meses de cadencia.

Patente	Patente prioritaria	Solicitud patente española	Solicitante
169.274	Española	1945. 17-III	<i>Destilaciones Aromáticas</i> [Bilbao]
170.951	1944. 14-IX [Gran Bretaña]	1945. 11-IX	<i>Herts Pharmaceuticals Limited / Roche Products Limited</i> [Gran Bretaña]
171.813	---	1945. 11-XII	<i>American Cynamid Company</i> [EE. UU.]
172.377	1944. 27-VI [EE.UU.]	1946. 30-I	<i>Hoffmann-La Roche Inc.</i> [EE. UU.]
172.503	---	1946. 8-II	<i>Carbonisation et Charbons Actifs S.A.</i> [Francia]
174.340	1945. 19-VII [EE.UU.]	1946. 17-VII	<i>Hoffmann-La Roche Inc.</i> [EE. UU.]
176.397	1946. 28-I [Gran Bretaña]	1947. 11-I	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
176.753	1946. 11-II [Gran Bretaña]	1947. 10-II	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
177.419	Española	1947. 31-III	<i>Julián Cardavilla del Barrio / Miguel Veníos</i> [Madrid]
178.294	Española	1947. 19-V	<i>José Romeu Guardiola</i> [Barcelona] / <i>Isidro Alsina Argemí</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Pedro Torrella Oliva</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Carlos Más Gibert</i> [Barcelona]
182.483	---	1948. 19-II	<i>The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.</i> [EE. UU.]
182.707	---	1948. 2-III	<i>The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.</i> [EE. UU.]
183.316	1947. 17-IV 1948. 17-III [Gran Bretaña]	1948. 16-IV	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
183.655	Española	1948. 11-V	<i>Jesús Barrachina Aparisi</i> [Valencia]
184.612	1947. 19-VII [Dinamarca]	1948. 17-VII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
184.673	1947. 26-VIII [Dinamarca]	1948. 22-VII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
185.490	1947. 27-X [EE.UU.]	1948. 7-X	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
185.882	1947. 10-XII [Dinamarca]	1948. 11-XI	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
186.709	1948. 13-V [Francia]	1949. 21-I	<i>Société des Usines Chimiques Rhone Poulenc</i> [Francia]

186.907	Española	1949. 5-II	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona]
187.163	1948. 7-IV [EE.UU.]	1949. 22-II	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
187.178	1948. 26-II [Dinamarca]	1949. 23-II	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
187.312	---	1949. 4-III	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
187.313	---	1949. 4-III	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
187.371	---	1949. 8-III	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
187.378	1948. 7-VIII [EE.UU.]	1949. 9-III	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
188.073	---	1949. 4-V	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
188.188	1948. 21-V [Dinamarca]	1949. 12-V	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
188.260	1948. 19-V [Dinamarca]	1949. 18-V	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
188.443	Española	1949. 31-V	<i>Laboratorios Vigoncal S.A.</i> [Madrid]
189.110	Española	1949. 16-VII	<i>EFEYN S.A.</i> [Madrid]
189.233	Española	1949. 27-VII	<i>EFEYN S.A.</i> [Madrid]
189.651	Española	1949. 8-IX	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona]
190.142	1948. 23-X [EE.UU.]	1949. 22-X	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]
190.143	1948. 23-X [EE.UU.]	1949. 22-X	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE.UU.]
190.471	1949. III [EE.UU.]	1949. 18-XI	<i>American Cyanamid Company</i> [EE. UU.]
192.353	1949. 25-V [Francia]	1950. 30-III	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia]
192.462	1949. 9-IV [Dinamarca]	1950. 8-IV	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
193.361	1949. 11-VI [Dinamarca]	1950. 10-VI	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
193.494	1949. 20-VI [Dinamarca]	1950. 19-VI	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
193.814	1949. 7-VII [Dinamarca]	1950. 6-VII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
195.938	Española	1950. 26-XII	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona]
196.992	---	1951. 13-III	<i>Eli Lilly and Company</i> [EE. UU.]
197.156	1950. 31-III [EE.UU.]	1951. 27-III	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
197.713	---	1951. 4-V	<i>Aktiebolaget Kabi</i> [Suecia]
198.008	1950. 24-V [EE.UU.]	1951. 23-V	<i>Comercial Solvents Corporation</i> [EE. UU.]
198.106	---	1951. 31-V	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
198.789	1950. 15-VII [EE.UU.]	1951. 13-VII	<i>Wyeth Inc.</i> [EE. UU.]

199.562	1950. 13-IX [Dinamarca]	1951. 12-IX	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
200.134	---	1951. 25-X	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
200.204	---	1951. 29-X	<i>Gewerkschaft Rheinpreussen</i> [Alemania]
202.360	1951. 6-IV [Francia]	1952. 7-III	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia]
205.780	Española	1952. 14-X	<i>Instituto de Biología y Sueroterapia</i> [Madrid]
206.205	Española	1952. 10-XI	<i>Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.</i> [Barcelona]
206.255	Española	1952. 13-XI	<i>Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.</i> [Barcelona]
206.653	Española	1952. 5-XII	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
206.654	Española	1952. 5-XII	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
206.655	Española	1952. 5-XII	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
208.018	1952. 29-II [Gran Bretaña]	1953. 27-II	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
208.132	1952. 10-III [Gran Bretaña]	1953. 7-III	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
208.204	---	1953. 12-III	<i>Biochemie Gesellschaft m.b.H.</i> [Austria]
208.539	---	1953. 28-III	<i>Rudolf Carl Reiter</i> [Dinamarca]
209.522	1952. 28-V [Dinamarca]	1953. 27-V	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
209.812	Española	1953. 16-VI	<i>Instituto de Farmacología Española</i> (Fundación Marqués de Urquijo S.L.) [Madrid]
210.533	1952. 28-VII [Alemania]	1853. 22-VII	<i>Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft</i> vormals <i>Meister Lucius & Brüning</i> [Alemania]
210.782	---	1953. 7-VIII	<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft m.b.H.</i> [Alemania]
210.907	---	1953. 19-VIII	<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft m.b.H.</i> [Alemania]
211.030	1952. 27-VIII [Gran Bretaña]	1953. 26-VIII	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
212.261	1952. 12-II [EE. UU.]	1953. 19-XI	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
213.291	1954. 11-IX [Portugal]	1954. 23-I	<i>Laboratorios del Dr. Esteve S.A.</i> [Barcelona]
213.519	1953. 6-II. [Gran Bretaña]	1954. 6-II	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
217.052	1953. 20-VIII [Dinamarca]	1954. 19-VIII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
217.456	Española	1954. 11-IX	<i>Laboratorios Atral L^{tda}</i> [Lisboa, Portugal] / <i>Laboratorios del Dr. Esteve S.A.</i> [Barcelona]
218.678	1953. 3-II [EE.UU.]	1954. 26-XI	<i>American Home Products Corporation</i> [EE. UU.]
221.679	1954. 5-V [Italia]	1955. 4-V	<i>Farmaceutici Italia S.A.</i> [Italia]
221.746	1954. 8-V [Italia]	1955. 7-V	<i>Farmaceutici Italia S.A.</i> [Italia]

222.304	---	1955. 8-VI	<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina]
223.973	Española	1955. 14-IX	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
223.974	Española	1955. 14-IX	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
224.139	[ilegible] [EE.UU.]	1955. 24-IX	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
224.622	1955. 6-VII [EE.UU.]	1955. 24-X	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]
224.971	Española	1955. 12-XI	<i>Instituto de Farmacología Española</i> (Fundación Marqués de Urquijo S.L.) [Madrid]
225.437	Española	1955. 6-XII	<i>Instituto de Farmacología Española</i> (Fundación Marqués de Urquijo S.L.) [Madrid]
225.454	Española	1955. 7-XII	<i>Instituto de Farmacología Española</i> (Fundación Marqués de Urquijo, S.L.) [Madrid]
225.960	Española	1956. 7-I	<i>Sociedad Española de Especialidades</i> <i>Fármaco-Terapéuticas S.A.</i> [Barcelona]
226.495	---	1956. 3-II	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia]
226.921	1955. 1-IV [Alemania]	1956. 25-II	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
227.116	Española	1956. 5-III	<i>Sociedad Española Basipa S.A. / Edelmiro</i> <i>Borrás López</i> [Barcelona]
229.788	---	1956. 12-VII	<i>Leo Industrie Chimique Farmaceutiche</i> [Italia]
231.221	---	1956. 8-X	<i>A/S Apothekernes Laboratorium for special-</i> <i>preparater</i> [Noruega]
231.233	---	1956. 9-X	<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina]
231.298	1955. 19-X [Gran Bretaña]	1956. 11-X	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
232.214	1955. 30-XI [Gran Bretaña]	1956. 29-XI	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
232.307	1955. 14-XII [Noruega]	1956. 5-XII	<i>A/S Apothekernes Laboratorium for special-</i> <i>preparater</i> [Noruega]
232.323	1955. 30-XII [Gran Bretaña]	1956. 6-XII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
234.998	1956. 2-V [Gran Bretaña]	1957. 23-IV	<i>Imperial Chemical Industries Limited</i> [Gran Bretaña]
235.510	1956. 18-V [Gran Bretaña]	1957. 17-V	<i>Imperial Chemical Industries Limited</i> [Gran Bretaña]
237.344	1956. 4-IX [Dinamarca]	1957. 29-VIII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
241.768	1957. 28-V [EE.UU.]	1958. 7-V	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]
246.912	1958. 30-I [Dinamarca]	1959. 29-I	<i>Novo Terapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca]
248.442	1958. 10-IV [Dinamarca]	1959. 4-IV	<i>Novo Terapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca]
251.912	---	1959. 5-IX	<i>Leo-Industrie Chimiche Farmaceutiche</i> [Italia]
252.422	1958. 6-X 1959. 12-V [Gran Bretaña]	1959. 2-X	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]

255.209	1959. 22-I 1959. 20-X 1959. 20-X 1959. 11-XI [Gran Bretaña]	1960. 22-I	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
255.210	1959. 30-I 1959. 16-III [Gran Bretaña]	1960. 22-I	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
256.969	1959. 31-III [Gran Bretaña]	1960. 30-III	<i>Société d'Etudes de Recerches et d'Applications Scientifiques et Medicinales (ERASM)</i> [Francia]
257.222	1959. 18-IV [Alemania]	1960. 7-IV	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
258.215	1959. 15-VII 1959. 19-VIII 1960. 20-IV [Gran Bretaña]	1960. 19-V	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
258.322	1959. 25-V 1959. 22-X [EE.UU.]	1960. 23-V	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
258.755	1959. 9-VII 1959.15-VII [Gran Bretaña]	1960. 8-VI	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
259.767	1959. 21-VII 1959. 26-VIII [Gran Bretaña]	1960. 20-VII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
260.157	1959. 5-VIII 1959. 29-IX [Gran Bretaña]	1960. 4-VIII	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
260.287	1959. 24-IX [Alemania]	1960. 10-VIII	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
260.626	1959. 24-IX [Alemania]	1960. 27-VIII	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
261.318	1959. 28-IX [EE.UU.]	1960. 27-IX	<i>Chas. Pfizer & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
261.363	1959. 30-IX [Gran Bretaña]	1960. 29-IX	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
261.390	1959. 2-X [EE.UU.]	1960. 30-IX	<i>Chas. Pfizer & Co. Inc.</i> [EE.UU.]
262.353	1959. 4-XII [Alemania]	1960. 11-XI	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
262.685	1959. 24-XI 1960. 1-III 1960. 17-IX [Austria]	1960. 23-XI	<i>Biochemie Gesellschaft m.b.H.</i> [Austria]
265.959	1960. 31-III 1960. 18-VII [Gran Bretaña]	1961. 22-III	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
266.718	---	1961. 13-IV	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
267.685	1960. 25-V [Gran Bretaña]	1961. 25-V	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
267.993	1960. 25-VIII [Gran Bretaña]	1961. 5-VI	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
269.080	1961. 18-I [Francia]	1861. 12-VII	<i>Société des Usines Chimiques Rhone-Poulenc</i> [Francia]
269.787	1961. 19-V [EE.UU.]	1961. 11-VIII	<i>Eli Lilly and Company</i> [EE. UU.]

270.875	1960. 14-X 1960. 8-XII [EE.UU.]	1961. 2-X	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
272.272	1960. 9-XII [Gran Bretaña]	1961. 7-XII	<i>May and Baker Limited</i> [Gran Bretaña]
273.089	1960. 9-XII [Gran Bretaña]	1961. 20-XII	<i>Novo Terapeutsik Laboratorium A/S</i> [Dinamarca]
275.555	1961. 23-III. [EE.UU.]	1962. 16-III	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
276.130	1961. 6-IV [Alemania]	1962. 3-IV	<i>Farbwerke Hoeschst Aktiengesellschaft</i> (<i>Meister Lucius & Brüning</i>) [Alemania]
278.857	1961. 4-VII 1961. 2-X [Gran Bretaña]	1962. 2-VII	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
279.025	1961. 21-VII [Gran Bretaña]	1962. 7-VII	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
280.079	1961. 16-VIII [EE.UU.]	1962. 16-VIII	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
280.469	Española	1962. 1-IX	<i>Instituto de Farmacología Española</i> (<i>Fundación Marqués de Urquijo S.L.</i>) [Madrid]
280.470	Española	1962. 1-IX	<i>Instituto de Farmacología Española</i> (<i>Fundación Marqués de Urquijo S.L.</i>) [Madrid]
280.753	1961. 26-IX 1962. 8-II [Gran Bretaña]	1962. 13-IX	<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia]
280.754	1962. 14-II [Gran Bretaña]	1962. 13-IX	<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia]
280.828	1961. 7-X [Alemania]	1962. 15-IX	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
284.254	1962. 29-I [EE.UU.]	1963. 17-I	<i>Bristol-Meyers Company</i> [EE.UU.]
284.536	1962. 26-1 [Suiza]	1963. 25-I	<i>J. R Geigy A.G.</i> [Suiza]
285.236	1962. 28-II 1962. 28-II [Gran Bretaña]	1963. 18-II	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
285.853	1962. 9-II [Suiza]	1963. 8-III	<i>J. R. Geigy A.G.</i> [Suiza]
285.863	1962. 13-III 1962. 13-III 1962. 13-III [EE.UU.]	1963. 8-III	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
287.497	1962. 27-IV 1962. 27-IV 1962. 27-IV [EE.UU.]	1963. 27-IV	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
287.498	1962. 27-IV [EE.UU.]	1963. 27-IV	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
287.499	1962. 27-IV [EE.UU.]	1963. 27-IV	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
289.148	1962. 30-VI [Gran Bretaña]	1963. 18-VI	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
289.688	Española	1963. 5-VII	<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona]

290.113	1962. 31-VIII 1963. 20-II [Francia]	1963. 19-VII	<i>Roussel-Uclaf</i> S.A. [Francia]
290.518	1962. 18-VIII [Gran Bretaña]	1963. 1-VIII	<i>Beecham Research Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña]
291.104	Española	1963. 10-VIII	<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona]
291.973	1962. 17-X [Gran Bretaña]	1963. 25-IX	<i>Beecham Research Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña]
292.910	1962. 2-XI [Gran Bretaña]	1963. 25-X	<i>Beecham Research Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña]
292.923	1962. 31-X [Alemania]	1963. 26-X	<i>Dr. Karl Thomae</i> G.M.B.H. [Alemania]
293.930	1962. 27-XI [Gran Bretaña]	1963. 27-XI	<i>Beecham Research Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña]

2.3.3.b. El período de tramitación

La tabla que sigue a estas líneas muestra, en días, el tiempo que tardó cada una de las patentes analizadas en ser aprobada, desde el momento de su presentación, y el transcurrido, desde entonces, hasta ser publicada la autorización.

Tiempo de tramitación de las patentes de penicilinas presentadas ante el registro español de patentes (1945-1963)					
Patente	Tipo	Solicitud	Concesión	Publicación	Solicitante
169.274	Invención	1945. 17-III	1945. 20-III 3 días	---	<i>Destilaciones Aromáticas</i> [Bilbao]
170.951	Invención	1945. 11-IX	1945. 24-XI 44 días	1945. 16-XII 22 días	<i>Herts Pharmaceuticals</i> Limited / <i>Roche Products</i> Limited [Gran Bretaña]
171.813	Invención	1945. 11-XII	1946. 9-IV 121 días	1946. 16-V 37 días	<i>American Cynamid</i> Company [EE.UU.]
172.377	Invención	1946. 30-I	1946. 13-IX 226 días	1946. 16-X 35 días	<i>Hoffmann-La Roche</i> Inc. [EE.UU.]
172.503	Invención	1946. 8-II	1946. 9-II 1 día	1946. 16-III 35 días	<i>Carbonisation et Charbons Actifs</i> S.A. [Francia]
174.340	Invención	1946. 17-VII	1946. 3-IX 48 días	1946. 1-X 28 días	<i>Hoffmann-La Roche</i> Inc. [EE.UU.]
176.397	Invención	1947. 11-I	1947. 13-I 2 días	1947. 1-III 47 días	<i>Glaxo Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña]
176.753	Invención	1947. 10-II	1947. 11-II 1 día	1947. 16-III 33 días	<i>Glaxo Laboratories</i> Limited [Gran Bretaña]
177.419	Invención	1947. 31-III	1947. 30-VI 91 días	1947. 1-X 93 días	<i>Julián Cardavilla del Barrio</i> / <i>Miguel Veníos</i> [Madrid]
178.294	Introducción	1947. 19-V	1947. 2-VI 14 días	1947. 1-VIII 60 días	<i>José Romeu Guardiola</i> [Barcelona] / <i>Isidro Alsina Argemí</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Pedro Torrella Oliva</i> [Sabadell, Barcelona] / <i>Carlos Más Gibert</i> [Barcelona]

182.483	Invención	1948. 19-II	1948. 20-II 1 día	1948. 16-IV 56 días	<i>The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.</i> [EE.UU.]
182.707	Certificado de adición	1948. 2-III	1948. 3-III 1 día	1948. 16-IV 44 días	<i>The Marcelle Fleischmann Foundation Inc.</i> [EE.UU.]
183.316	Invención	1948. 16-IV	1948. 6-XI 143 días	1948. 1-XII 56 días	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
183.655	Invención	1948. 11-V	1948. 25-VI 45 días	1948. 1-XI 129 días	<i>Jesús Barrachina Aparisi</i> [Valencia]
184.612	Invención	1948. 17-VII	1948. 17-XI 123 días	1948. 16-XII 29 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
184.673	Invención	1948. 22-VII	1949. 2-III 195 días	1949. 1-IV 30 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
185.490	Invención	1948. 7-X	1948. 18-XII 72 días	1949. 1-II 45 días	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
185.882	Invención	1948. 11-XI	1949. 3-I 53 días	1949. 1-II 29 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
186.709	Invención	1949. 21-I	1949. 28-I 7 días	1949. 16-III 47 días	<i>Société des Usines Chimiques Rhone Poulenc</i> [Francia]
186.907	Invención	1949. 5-II	1949. 7-II 2 días	1949. 16-III 37 días	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona]
187.163	Invención	1949. 22-II	1949. 20-IV 57 días	1949. 16-VI 57 días	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
187.178	Certificado de adición	1949. 23-II	1949. 24-II 1 día	1949. 16-IV 51 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
187.312	Invención	1949. 4-III	1949. 8-VI 96 días	1949. 16-VII 38 días	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
187.313	Invención	1949. 4-III	1949. 23-V 80 días	1949. 16-VII 55 días	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
187.371	Introducción	1949. 8-III	1949. 23-V 76 días	1949. 16-VII 54 días	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
187.378	Invención	1949. 9-III	1949. 23-V 73 días	1949. 16-VII 54 días	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
188.073	Invención	1949. 4-V	1949. 5-V 1 día	1949. 16-VI 42 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
188.188	Invención	1949. 12-V	1949. 13-V 1 días	1949. 1-VII 48 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
188.260	Invención	1949. 18-V	1949. 19-V 1 día	1949. 1-VII 43 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
188.443	Invención	1949. 31-V	1949. 1-IX 93 días	1949. 1-XII 91 días	<i>Laboratorios Vigoncal S.A.</i> [Madrid]
189.110	Invención	1949. 16-VII	1949. 19-VII 3 días	1949. 1-X 74 días	<i>EFEYN S.A.</i> [Madrid]
189.233	Invención	1949. 27-VII	1949. 28-VII 1 día	1949. 1-X 65 días	<i>EFEYN S.A.</i> [Madrid]
189.651	Invención	1949. 8-IX	1949. 13-IX 5 días	1949. 1-XII 79 días	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona]

190.142	Invención	1949. 22-X	1949. 16-XI 24 días	1950. 1-I 46 días	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]
190.143	Invención	1949. 22-X	1949. 12-XI 20 días	1950. 1-I 50 días	<i>Schenley Industries, Inc.</i> [EE. UU.]
190.471	Invención	1949. 18-XI	1949. 19-XI 1 día	1950. 16-I 58 días	<i>American Cyanamid Company</i> [EE. UU.]
192.353	Invención	1950. 30-III	1951. 22-II 329 días	1951. 16-III 24 días	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia]
192.462	Invención	1950. 8-IV	1951. 27-II 325 días	1951. 1-IV 33 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
193.361	Invención	1950. 10-VI	---	1951. 1-VIII [416 días]	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
193.494	Invención	1950. 19-VI	1951. 10-VII 386 días	1951. 1-VIII 22 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
193.814	Invención	1950. 6-VII	1951. 24-VII 383 días	1951. 16-IX 54 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
195.938	Certificado de adición	1950. 26-XII	1950. 27-XII 1 día	1951. 1-II 36 días	<i>Enrique Bassas Grau</i> [Barcelona]
196.992	Invención	1951. 13-III	1953. 28-II 718 días	1953. 1-IV 32 días	<i>Eli Lilly and Company</i> [EE. UU.]
197.156	Invención	1951. 27-III	1953. 4-III 708 días	1953. 1-IV 32 días	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
197.713	Invención	1951. 4-V	1951. 5-V 1 días	1951. 1-VI 26 días	<i>Aktiebolaget Kabi</i> [Suecia]
198.008	Invención	1951. 23-V	1951. 25-V 2 días	1951. 16-VI 21 días	<i>Comercial Solvents Corporation</i> [EE. UU.]
198.106	Invención	1951. 31-V	1951. 1-VI 1 día	1951. 1-VII 30 días	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
198.789	Invención	1951. 13-VII	1951. 20-VII 7 días	1951. 1-IX 43 días	<i>Wyeth Inc.</i> [EE. UU.]
199.562	Invención	1951. 12-IX	1951. 5-X 23 días	1951. 16-XI 41 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
200.134	Certificado de adición	1951. 25-X	---	1953. 16-IX [671] días	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
200.204	Invención	1951. 29-X	1951. 5-XI 6 días	1951. 16-XII 41 días	<i>Gewerkschaft Rheinpreussen</i> [Alemania]
202.360	Certificado de adición	1952. 7-III	1952. 10-III 3 días	1952. 1-IV 22 días	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia].
205.780	Invención	1952. 14-X	1953. 17-VII 276 días	1953. 16-IX 61 días	<i>Instituto de Biología y Sueroterapia</i> [Madrid]
206.205	Invención	1952. 10-XI	1952. 22-XI 12 días	1953. 1-I 40 días	<i>Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.</i> [Barcelona]
206.255	Introducción	1952. 13-XI	1952. 24-XI 11 días	1953. 1-I 38 días	<i>Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.</i> [Barcelona]
206.653	Invención	1952. 5-XII	1953. 13-II 70 días	1953. 16-III 33 días	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]

206.654	Invención	1952. 5-XII	1952. 13-II 70 días	1953. 16-III 33 días	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
206.655	Invención	1952. 5-XII	1952. 13-II 70 días	1953. 16-III 33 días	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
208.018	Invención	1953. 27-II	1953. 2-IX 214 días	1953. 1-XI 60 días	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
208.132	Invención	1953. 7-III	1953. 27-IV 51 días	1953. 1-VI 35 días	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
208.204	Invención	1953. 12-III	1954. 9-IV 393 días	1954. 1-VI 53 días	<i>Biochemie Gesellschaft m.b.H.</i> [Austria]
208.539	Invención	1953. 28-III	1954. 22-IV 390 días	1954. 1-VI 54 días	<i>Rudolf Carl Reiter</i> [Dinamarca]
209.522	Invención	1953. 27-V	1954. 24-V 362 días	1954. 1-VII 38 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
209.812	Introducción	1953. 16-VI	1954. 5-I 203 días	1954. 16-II 42 días	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid]
210.533	Invención	1953. 22-VII	1954. 26-X 461 días	1954. 11-XII 36 días	<i>Farbwerke Hoechts A.G., vormals Meister Lucius & Brunnig</i> [Alemania]
210.782	Invención	1953. 7-VIII	1953. 10-IX 34 días	1953. 16-X 36 días	<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft m.b.H.</i> [Alemania]
210.907	Invención	1953. 19-VIII	1954. 11-XI 449 días	1954. 16-XII 35 días	<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft m.b.H.</i> [Alemania]
211.030	Invención	1953. 26-VIII	1953. 27-XI 93 días	1954. 1-I 35 días	<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
212.261	Introducción	1953. 19-XI	1955. 20-I 427 días	1955. 1-III 40 días	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
213.291	Invención	1954. 23-I	1954. 22-V 142 días	1954. 1-VII 40 días	<i>Laboratorios del Dr. Esteve S.A.</i> [Barcelona]
213.519	Invención	1954. 6-II	1955. 17-III 394 días	1955. 16-IV 30 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
217.052	Invención	1954. 19-VIII	1955. 20-X 428 días	1955. 1-XII 42 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
217.456	Invención	1954. 11-IX	1954. 9-X 28 días	1954. 16-XI 68 días	<i>Laboratorios Atral L^{da}</i> [Portugal] / <i>Laboratorios del Dr. Esteve S.A.</i> [Barcelona]
218.678	Invención	1954. 26-XI	1954. 14-III 257 días	1955. 16-IV 141 días	<i>American Home Products Corporation</i> [EE. UU.]
221.679	Invención	1955. 4-V	1955. 18-X 167 días	1955. 1-XII 63 días	<i>Farmaceutici Italia S.A.</i> [Italia]
221.746	Invención	1955. 7-V	1955. 18-X 164 días	1955. 1-XII 43 días	<i>Farmaceutici Italia S.A.</i> [Italia]
222.304	Invención	1955. 8-VI	1955. 18-X 132 días	1955. 1-XII 43 días	<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina]
223.973	Invención	1955. 14-IX	1955. 7-XI 54 días	1955. 16-XII 39 días	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]

223.974	Invención	1955. 14-IX	1955. 7-XI 54 días	1955. 16-XII 39 días	<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]
224.139	Invención	1955. 24-IX	1955. 2-XII 8 días	1956. 1-II 61 días	<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]
224.622	Invención	1955. 24-X	1955. 7-XI 13 días	1955. 16-XII 39 días	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]
224.971	Invención	1955. 12-XI	1955. 23-XII 41 días	1956. 1-II 40 días	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid]
225.437	Introducción	1955. 6-XII	1956. 14-I 39 días	1956. 16-II 33 días	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid]
225.454	Invención	1955. 7-XII	1956. 16-I 40 días	1956. 16-II 31 días	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid]
225.960	Invención	1956. 7-I	1956. 18-IV 102 días	1956. 1-VI 44 días	<i>Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas S.A.</i> [Barcelona]
226.495	Invención	1956. 3-II	1956. 24-II 21 días	1956. 1-IV 37 días	<i>Les Laboratoires Français de Chimotherapie</i> [Francia]
226.921	Invención	1956. 25-II	1956.15-III 50 días	1956. 1-V 40 días	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
227.116	Invención	1956. 5-III	1956. 14-III 9 días	1956. 1-V 48 días	<i>Sociedad Española Basipa S.A. / Edelmiro Borrás López</i> [Barcelona]
229.788	Invención	1956. 12-VII	1957. 2-II 205 días	1957. 1-IV 58 días	<i>Leo Industrie Chimique Farmaceutiche</i> [Italia]
231.221	Invención	1956. 8-X	1957. 10-I 94 días	1957. 16-III 65 días	<i>A/S Apothekernes Laboratorium for special-preparater</i> [Noruega]
231.233	Invención	1956. 9-X	1957. 10-I 93 días	1957. 16-III 65 días	<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina]
231.298	Invención	1956. 11-X	1957. 12-III 152 días	1957. 16-V 65 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
232.214	Certificado de adición	1956. 29-XI	1957. 25-III 116 días	1957. 1-VII 98 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
232.307	Invención	1956. 5-XII	1957. 3-III 88 días	1957. 16-VI 105 días	<i>A/S Apothekernes Laboratorium for special-preparater</i> [Noruega]
232.323	Certificado de adición	1956. 6-XII	1957. 12-III 96 días	1957. 1-VII 111 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
234.998	Invención	1957. 23-IV	1957. 30-IV 7 días	1957. 16-XI 200 días	<i>Imperial Chemical Industries Limited</i> [Gran Bretaña]

235.510	Invención	1957. 17-V	1957. 3-VI 17 días	1957. 1-XII 200 días	<i>Imperial Chemical Industries Limited</i> [Gran Bretaña]
237.344	Invención	1957. 29-VIII	1957. 15-X 47 días	1957. 16-XII 61 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
241.768	Invención	1958. 7-V	1958. 30-V 23 días	1958. 16-XI 170 días	<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]
246.912	Invención	1959. 29-I	1959. 30-III 60 días	1959. 1-VI 63 días	<i>Novo Terapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca]
248.442	Invención	1959. 4-IV	1959. 14-V 40 días	1959. 16-VIII 103 días	<i>Novo Terapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca]
251.912	Invención	1959. 5-IX	1960. 11-III 188 días	1960. 16-V 66 días	<i>Leo, Indutria Chimiche Farmaceutiche S.p.A.</i> [Italia]
252.422	Invención	1959. 2-X	1959. 2-XI 30 días	1960. 1-I 60 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
255.209	Invención	1960. 22-I	1960- 7-III 45 días	1960. 16-V 71 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
255.210	Invención	1960. 22-1	1960. 22-III 60 días	1960. 1-VI 71 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
256.969	Invención	1960. 30-III	1960. 30-VII 152 días	1960. 16-X 78 días	<i>Société d'Etudes de Recerches et d'Aplications Scientifiques et Medicinales</i> [Francia]
257.220	Invención	1960. 7-IV	1960. 29-IV 22 días	1960. 16-VI 48 días	<i>Farbenfabriken Bayer A.G.</i> [Alemania]
258.215	Invención	1960. 19-V	1960. 13-VII 55 días	1960. 16-X. 95 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
258.322	Invención	1960. 23-V	1960. 22-VI 30 días	1960. 16-IX 86 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
258.755	Invención	1960. 8-VI	1960. 15-IX 99 días	1960. 16-XI 61 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
259.767	Invención	1960. 20-VII	1960. 10-XII 143 días	1961. 16-I 37 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
260.157	Invención	1960. 4-VIII	1960. 15-IX 42 días	1960. 1-XI 47 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]
260.287	Invención	1960. 10-VIII	1960. 15-IX 36 días	1960. 1-XI 46 días	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
260.626	Invención	1960. 27-VII	1960. 14-IX 18 días	1960. 16-XI 63 días	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
261.318	Invención	1960. 27-IX	1960. 19-XII 83 días	1961. 1-II 44 días	<i>Chas. Pfizer & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
261.363	Invención	1960. 29-IX	1961. 4-III 156 días	1961. 16-V 73 días	<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]

261.390	Invención	1960. 30-IX	1960. 9-XII 39 días	1961. 16-I 38 días	<i>Chas. Pfizer & Co.</i> [EE.UU.]
262.353	Invención	1960. 11-XI	1960. 7-XII 26 días	1961. 16-I 40 días	<i>Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft</i> [Alemania]
262.685	Invención	1960. 23-XI	1960. 12-I 284 días	1961. 1-III 98 días	<i>Biochemie Gesellschaft m.b.H.</i> [Austria]
265.959	Invención	1961. 22-III	1961. 20-V 59 días	1961. 1-VIII 73 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
266.718	Invención	1961. 13-IV	1961. 30-V 47 días	1961. 16-VIII 108 días	<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]
267.685	Invención	1961. 25-V	1961. 20-IX 118 días	1961. 16-XI 47 días	<i>Dovens Kemiske Fabrik ved a. Kongsted</i> [Dinamarca]
267.993	Certificado de adición	1961. 5-VI	1961. 12-VII 37 días	1961. 16-X 96 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
269.089	Invención	1961. 12-VII	1961. 30-X 110 días	1961. 16-XII 47 días	<i>Rhône-Poulenc S.A.</i> [Francia]
269.787	Invención	1961. 11-VIII	1961. 30-IX 50 días	1961. 16-XI 46 días	<i>Eli Lilly and Company</i> [EE. UU.]
270.875	Invención	1961. 2-X	1961. 15-XI 43 días	1962. 1-I 47 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
272.772	Invención	1961. 7-XII	1962. 2-I 26 días	1962. 1-III 58 días	<i>May Baker Ltd.</i> [Gran Bretaña]
273.089	Invención	20-XII-1961	13-IV-1962 103 días	1-VI-1962 49 días	<i>Novo Terapeutisk Laboratorium A.S.</i> [Dinamarca]
275.555	Invención	1962. 16-III	1962. 28-III 12 días	1962. 16-V 43 días	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
276.130	Invención	1962. 3-IV	1962. 28-IX 178 días	1962. 1-XII 33 días	<i>Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft (Meister Lucius & Brüning)</i> [Alemania]
278.857	Invención	1962. 2-VII	1962. 22-IX 82 días	1962. 1-XI 39 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
279.025	Invención	1962. 7-VII	1962. 24-IX 79 días	1962. 1-XI 38 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
280.079	Invención	1962. 16-VIII	1963. 25-III 252 días	1963. 1-VI 68 días	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
280.469	Invención	1962. 1-IX	1962. 24-X 53 días	1963. 16-I 83 días	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid]
280.470	Invención	1962. 1-IX	1962. 24-X 53 días	1963. 16-I 83 días	<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid]
280.753	Invención	1962. 13-IX	1962. 24-XI 82 días	1963. 1-II 69 días	<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia]
280.754	Invención	1962. 13-IX	1962. 24-XI 82 días	1963. 1-II 69 días	<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia]

280.828	Certificado de adición	1962. 15-IX	1962. 10-XI 56 días	1963. 16-II 98 días	<i>Farbenfabriken Bayer A.G.</i> [Alemania]
284.254	Invención	1963. 17-I	1963. 5-VI 139 días	1963. 16-VII 41 días	<i>Bristol Myers Co.</i> [EE. UU.]
284.536	Invención	1963. 25-I	1963. 20-II 26 días	1963. 1-VII 131 días	<i>J. R. Geigy A. G.</i> [Suiza]
285.236	Invención	1963. 18-II	1963. 1-III 11 días	1963. 1-VI 91 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
285.853	Invención	1963. 8-III	1963. 6-VII 120 días	1963. 16-VIII 41 días	<i>J. R. Geigy A. G.</i> [Suiza]
285.863	Invención	1963. 8-III	1963. 23-IV 46 días	1963. 16-VI 92 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
287.497	Invención	1963. 27-IV	1963. 19-X 175 días	1963. 1-XII 43 días	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
287.498	Invención	1963. 27-IV	1963. 19-X 175 días	1963. 1-XII 43 días	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
287.499	Invención	1963. 27-IV	1963. 21-X 177 días	1963. 1-XII 41 días	<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]
289.148	Invención	1963. 18-VI	1963. 17-IX 91 días	1963. 1-XI 45 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
289.688	Invención	1963. 5-VII	1963. 10-VII 5 días	1963-1-XI 114 días	<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona]
290.113	Invención	1963. 19-VII	1963. 11-X 84 días	1963. 1-XI 51 días	<i>Roussel-Uclaf S.A.</i> [Francia]
290.518	Invención	1963. 1-VIII	1963. 7-IX 37 días	1963. 16-X 29 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Inglaterra]
291.104	Invención	1963. 10-VIII	1963-10-IX 31 días	1963. 16-XI 67 días	<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona]
291.973	Certificado de adición	1963. 25-IX	1963. 30-X 35 días	1963. 16-XII 36 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
292.910	Invención	1963. 25-X	1963. 3-XII 39 días	1964. 16-I 44 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]
292.923	Invención	1963. 26-X	1964. 24-I 90 días	1964. 1-III 37 días	<i>Kkarl Thomae G.M.B.H.</i> [Alemania]
293.930	Invención	1963. 27-XI	1964. 25-I 69 días	1964. 1-III 36 días	<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]

Los datos, ordenados por quinquenios, y segregando del conjunto las patentes promovidas por empresas españolas y extranjeras se indican en las tablas que siguen:

Promedio de tiempo de tramitación de las patentes de penicilinas presentadas ante el registro español de patentes (1945-1963)				
Período	Patentes concedidas	Tiempo medio de concesión	Tiempo medio de publicación	Tiempo medio de tramitación
1945	3	56,0 días	29,5 días	85,5 días
1946-1950	39	78,5 días	50,2 días	128,7 días
1951-1955	42	171,1 días	42,5 días	213,6 días
1956-1960	35	77,9 días	75,6 días	153,5 días
1961-1963	36	79,8 días	60,5 días	140,3 días
Total	155	103,0 días	56,0 días	159,0 días

Salvo el quinquenio correspondiente a 1951-1955, el tiempo medio de trámite para la concesión de las patentes de penicilina parece establecerse en torno a los 80 días; el de la publicación en las páginas del *Boletín Oficial de la Propiedad Industrial* se fija en algo más de los cincuenta días, con una bajada sensible en el período en que el período de tramitación de la concesión parece mayor. Alrededor de los 160 días es el tiempo medio que tarda en diligenciarse un expediente de penicilina en estos primeros años del Franquismo; parece que los primeros expedientes se tramitaron con algo más de celeridad administrativa.

En cualquier caso, la tramitación de las patentes presentadas por empresas españolas parece resolverse con algo más de celeridad que las de autores extranjeros; en poco más de 100 días desde la presentación del expediente, la aceptación de la patente es publicada. Entre las patentes extranjeras, la valoración media del expediente tarda en torno a los cien diez días y el tiempo medio de publicación ronda los sesenta, por lo que alcanza un promedio de algo más de 170 días.

Promedio de tiempo de tramitación de las patentes de penicilinas presentadas ante el registro español de patentes por empresas españolas (1945-1963)				
Período	Patentes concedidas	Tiempo medio de concesión	Tiempo medio de publicación	Tiempo medio de tramitación
1945	1	3,0 días	--	--
1946-1950	9	28,3 días	73,8 días	102,1 días
1951-1955	14	79,3 días	40,7 días	120,0 días
1956-1960	2	55,5 días	46,0 días	101,5 días
1961-1963	4	35,5 días	86,8 días	122,3 días
Total	30	54,0 días	57,7 días	111,7 días

Promedio de tiempo de tramitación de las patentes de penicilinas presentadas ante el registro español de patentes por empresas extranjeras (1945-1963)				
Período	Patentes concedidas	Tiempo medio de concesión	Tiempo medio de publicación	Tiempo medio de tramitación
1945	2	82,5 días	29,5 días	112,0 días
1946-1950	30	94,0 días	42,9 días	136,9 días
1951-1955	28	218,7 días	43,4 días	262,1 días
1956-1960	33	79,3 días	77,7 días	157,0 días
1961-1963	32	85,3 días	57,2 días	142,5 días
Total	125	115,0 días	55,8 días	170,8 días

Los tiempos de registro de patentes de sulfamidas son, para los mismos períodos quinquenales, por término medio, bastante similares que los requeridos para penicilinas; si bien parece apreciarse una mayor velocidad administrativa durante los primeros años de registro de penicilinas (1945-1950), en los quinquenios siguientes esta celeridad desaparece, para igualarse -o incluso ser inferior (1951-1960)- al tiempo medio que tardan en registrarse los nuevos procedimientos de sulfamidas. Lo cual podría interpretarse como un inicial interés por este tipo de productos que acaba diluyéndose en el tiempo.

El que el número de procedimientos de sulfamidas registradas en España sea menor, en el período de tiempo estudiado, que el de los relativos a penicilinas, parece poner de manifiesto que las penicilinas desplazaron a las sulfamidas, al menos en el

interés de las empresas con voluntad de patentar sus procedimientos. Las patentes relacionadas con sulfamidas conocen su mayor florecimiento en el quinquenio 1941-1945; momento de inicio del registro de patentes de penicilinas que, desde entonces, alcanzan cifras significativamente superiores.

Promedio de tiempo de tramitación de las patentes de sulfamidas y penicilinas presentadas ante el registro español de patentes (1938-1963)									
	Sulfamidas					Penicilinas			
	A	B	C	D		A	B	C	D
1938-1940	4	421,5 días	103,0 días	524,5 días		--	--	--	--
1941-1945	12	272,2 días	124,8 días	397,0 días		3	56,0 días	29,5 días	85,5 días
1946-1950	4	133,2 días	35,2 días	168,5 días		39	78,5 días	50,2 días	128,7 días
1951-1955	2	134,5 días	36,5 días	171,0 días		42	171,1 días	42,5 días	213,6 días
1956-1960	8	47,6 días	97,4 días	145,0 días		35	77,9 días	75,6 días	153,5 días
1961-1963	6	89,4 días	72,0 días	161,3 días		36	79,8 días	60,5 días	140,3 días
Total	36	180,6 días	103,4 días	208,6 días		155	103,0 días	56,0 días	159,0 días
A. Patentes concedidas / B. Tiempo medio de concesión / C. Tiempo medio de publicación / D. Tiempo medio de tramitación									

2.3.b. La publicidad de las patentes de penicilinas registradas en España a través de la revista *Ión*

Desde su aparición en agosto de 1941, *Ión*, la ‘revista del Sindicato Nacional de Industrias Químicas’ se hizo eco -si bien no de manera inmediata- de las patentes publicadas en el *Boletín Oficial de la Propiedad Industrial*, aumentando así su ámbito de difusión. *Ión* no referenció todas las patentes de penicilinas registradas, comenzó a ocuparse de ellas en enero de 1954, para publicitar un par de ellas propiedad de la empresa barcelonesa *Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.* y, pocos días después, tres de los procedimientos registrados por *Antibióticos S.A.*

La tabla que sigue recoge las patentes que sí fueron anotadas en las páginas de *Ión* y el tiempo -en días- que tardaron en ser transferidas desde las páginas del *BOPI* a las de la ‘revista del Sindicato Nacional de Industrias Químicas’.

Noticias sobre las patentes de sulfamidas publicadas por la revista <i>Ión</i> (1953-1965)			
Laboratorio	Patente	Publicación	<i>Ión</i>
<i>Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.</i> [Barcelona]	206.205	1953. 1-I	<i>Ión</i> , 14(150): 49. 1954 [I] 365 días

<i>Unión Química Farmacéutica S.A.E.</i> [Barcelona]	206.255	1953. 1-I	<i>Ión</i> , 14(150): 49. 1954 [I] 365 días
<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]	206.653	1953. 16-III	<i>Ión</i> , 14(152): 109. 1954 [II] 322 días
<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]	206.654	1953. 16-III	<i>Ión</i> , 14(152): 109. 1954 [II] 322 días
<i>Antibióticos S.A.</i> [Madrid]	206.655	1953. 16-III	<i>Ión</i> , 14(152): 109. 1954 [II] 322 días
<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	208.018	1953. 1-XI	<i>Ión</i> , 14(150): 49. 1954 [I] 61 días
<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft</i> m.b.H. [Alemania]	210.782	1953. 16-X	<i>Ión</i> , 14(150): 49. 1954 [I] 77 días
<i>Chemie Grünenthal Gesellschaft</i> m.b.H. [Alemania]	210.907	1954. 16-XII	<i>Ión</i> , 15(162): 47. 1955. [I] 16 días
<i>Glaxo Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	211.030	1954. 1-I	<i>Ión</i> , 14(152): 109. 1954 [II] 31 días
<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A.</i> <i>Kongsted</i> [Dinamarca]	217.052	1955. 1-XII	<i>Ión</i> , 16(176): 192. 1956 [III] 91 días
<i>Farmaceutici Italia S.A.</i> [Italia]	221.679	1955. 1-XII	<i>Ión</i> , 16(176): 193. 1956 [III] 91 días
<i>Farmaceutici Italia S.A.</i> [Italia]	221.746	1955. 1-XII	<i>Ión</i> , 16(176): 193. 1956 [III] 91 días
<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina]	222.304	1955. 1-XII	<i>Ión</i> , 16(183): 613. 1956 [X] 304 días
<i>Bristol Laboratories Inc.</i> [EE. UU.]	224.139	1956. 1-II	<i>Ión</i> , 16(184): 674. 1956 [XI] 274 días
<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]	224.622	1955. 16-XII	<i>Ión</i> , 16(180): 433. 1956 [VII] 183 días
<i>Instituto de Farmacología Española</i> (Fundación Marqués de Urquijo S.L.) [Madrid]	224.971	1956. 1-II	<i>Ión</i> , 16(185): 726. 1956 [XII] 354 días
<i>Sociedad Española de Especialidades</i> <i>Fármaco-Terapéuticas S.A.</i> [Barcelona]	225.960	1956. 1-VI	<i>Ión</i> , 16(185): 727. 1956 [XII] 183 días
<i>Leo Industrie Chimique</i> <i>Farmaceutiche</i> [Italia]	229.788	1957. 1-IV	<i>Ión</i> , 18(209): 729. 1958 [I] 274 días
<i>A/S Apothekernes Laboratorium for</i> <i>special-preparater</i> [Noruega]	231.221	1957. 16-III	<i>Ión</i> , 17(193): 459. 1957 [VIII] 166 días
<i>Sebastián Bagó Basagañas</i> [Argentina]	231.233	1957. 16-III	<i>Ión</i> , 17(193): 459. 1957 [VIII] 138 días
<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A.</i> <i>Kongsted</i> [Dinamarca]	231.298	1957. 16-V	<i>Ión</i> , 17(195): 585. 1957 [X] 138 días
<i>A/S Apothekernes Laboratorium for</i> <i>special-preparater</i> [Noruega]	232.307	1957. 16-VI	<i>Ión</i> , 18(204): 452. 1958 [IX] 414 días
<i>Schenley Industries Inc.</i> [EE. UU.]	241.768	1958. 16-XI	<i>Ión</i> , 20(222): 31. 1960 [I] 411 días
<i>Novo Terapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca]	246.912	1959. 1-VI	<i>Ión</i> , 20(229): 506. 1960 [VIII] 426 días
<i>Novo Terapeutisk Laboratorium A/S</i> [Dinamarca]	248.442	1959. 16-VIII	<i>Ión</i> , 21(236): 165. 1961 [III] 563 días
<i>Beecham Research Laboratories</i> <i>Limited</i> [Gran Bretaña]	255.209	1960. 16-V	<i>Ión</i> , 21(241): 480. 1961 [VIII] 411 días
<i>Société d'Etudes de Recherches et</i> <i>d'Aplications Scientifiques et</i> <i>Medicinales (ERASM)</i> [Francia]	256.969	1960. 16-X	<i>Ión</i> , 21(245): 710. 1961 [XII] 380 días
<i>Beecham Research Laboratories</i> <i>Limited</i> [Gran Bretaña]	258.755	1960. 16-XI	<i>Ión</i> , 21(245): 710. 1961 [XII] 350 días
<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A.</i> <i>Kongsted</i> [Dinamarca]	259.767	1961. 16-I	<i>Ión</i> , 22(246): 43. 1962 [I] 350 días

<i>Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted</i> [Dinamarca]	260.157	1960. 1-XI	<i>Ión</i> , 22(249): 252. 1962 [IV] 517 días
<i>Chas. Pfizer & Co. Inc.</i> [EE. UU.]	261.318	1961. 1-II	<i>Ión</i> , 22(249): 252. 1962 [IV] 425 días
<i>Biochemie Gesellschaft m.b.H.</i> [Austria]	262.685	1961. 1-III	<i>Ión</i> , 22(253): 249. 1962 [IV] 397 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	265.959	1961. 1-VIII	<i>Ión</i> , 22(255): 638. 1962 [X] 427 días
<i>Merck & Co. Inc.</i> [EE. UU.]	266.718	1961. 16-VIII	<i>Ión</i> , 22(225): 639. 1962 [X] 412 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	267.993	1961. 16-X	<i>Ión</i> , 22(225): 639. 1962 [X] 350 días
<i>Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft (Meister Lucius & Brüning)</i> [Alemania]	276.130	1962. 1-XII	<i>Ión</i> , 23(266): 540. 1963 [IX] 274 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	278.857	1962. 1-XI	<i>Ión</i> , 24(271): 103. 1964 [II] 457 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	279.025	1962. 1-XI	<i>Ión</i> , 24(271): 103. 1964 [II] 457 días
<i>Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)</i> [Madrid]	280.470	1963. 16-I	<i>Ión</i> , 24(271): 103. 1964 [II] 365 días
<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia]	280.753	1963. 1-II	<i>Ión</i> , 24(271): 103. 1964 [II] 365 días
<i>Lepetit S.p A.</i> [Italia]	280.754	1963. 1-II	<i>Ión</i> , 24(271): 103. 1964 [II] 365 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	285.236	1963. 1-VI	<i>Ión</i> , 24(280): 650. 1964 [XI] 489 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	285.863	1963. 16-VI	<i>Ión</i> , 24(280): 651. 1964 [XI] 504 días
<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]	287.497	1963. 1-XII	<i>Ión</i> , 24(281): 712. 1964 [XII] 366 días
<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]	287.498	1963. 1-XII	<i>Ión</i> , 24(281): 712. 1964 [XII] 366 días
<i>Bristol-Myers Company</i> [EE. UU.]	287.499	1963. 1-XII	<i>Ión</i> , 24(281): 712. 1964 [XII] 366 días
<i>Beecham Research Laboratories, Limited</i> [Gran Bretaña]	289.148	1963. 1-XI	<i>Ión</i> , 25(282): 37. 1965 [I] 427 días
<i>José Robert Mestre</i> [Barcelona]	289.688	1963-1-XI	<i>Ión</i> , 25(282): 37. 1965 [I] 427 días
<i>Roussel-Uclaf S.A.</i> [Francia]	290.113	1963. 1-XI	<i>Ión</i> , 24(280): 650. 1964 [XI] 366 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	290.518	1963. 16-X	<i>Ión</i> , 25(283): 92. 1965 [II] 473 días
<i>Beecham Research Laboratories Limited</i> [Gran Bretaña]	292.910	1964. 16-I	<i>Ión</i> , 25(286): 276. 1965 [V] 471 días

Tabla comparativa entre las patentes registradas en España y las recensionadas por la revista *Ión* (1953-1965)

	Patentes registradas	Patentes recensionadas	Tiempo medio entre la publicación oficial y la reseña en <i>Ión</i>
España	14	9	336,1 días
Gran Bretaña	24	13	377,5 días
EE.UU.	15	8	350,4 días
Francia	4	2	373,0 días
Dinamarca	15	6	347,5 días
Alemania	11	3	122,3 días

Austria	2	1	397,0 días
Italia	6	5	237,2 días
Argentina	2	2	221,0 días
Noruega	2	2	290,0 días
Suiza	2	--	
Total	97	51	324,3 días

De las 97 patentes de penicilinas registradas entre 1954 y 1963, las páginas de *Ión* se hicieron eco de 51 de ellas; si bien las primeras recensionadas fueron españolas, tras ellas siguieron las del resto de los países, sin que parezca definirse ninguna tendencia, ni entre las patentes seleccionadas, ni entre los países que registran sus patentes en España. El tiempo que tarda en anunciar la revista *Ión* una patente de penicilina registrada en nuestro país se aproxima al año, una media similar a la observada para las patentes de sulfamidas.

Tabla comparativa entre las patentes registradas en España y las recensionadas por la revista <i>Ión</i> (1953-1965)			
	Patentes registradas	Patentes recensionadas	Tiempo medio entre la publicación oficial y la reseña en <i>Ión</i>
España	14	9	336,1 días
Gran Bretaña	24	13	377,5 días
EE.UU.	15	8	350,4 días
Francia	4	2	373,0 días
Dinamarca	15	6	347,5 días
Alemania	11	3	122,3 días
Austria	2	1	397,0 días
Italia	6	5	237,2 días
Argentina	2	2	221,0 días
Noruega	2	2	290,0 días
Suiza	2	--	
Total	97	51	324,3 días

CONCLUSIONES

1ª Durante el período que media entre los inicios de la guerra civil de 1936 y los días finales de 1963, fecha de la aprobación del Primer Plan de Desarrollo (1964-1967), y de la Ley de bases de la Seguridad Social, se patentaron en España 36 procedimientos relacionados con sulfamidas *sensu stricto* y 155 correspondientes a penicilinas.

2ª La primera patente de fabricación española de sulfamida se debe a Antonio Esteve Subirana [*Laboratorios Dr. Esteve*] quien, en abril de 1938, presentó su solicitud sobre un “Procedimiento para la preparación de la para-aminofenil sulfamida” (patente 144.173); siguieron a ésta, hasta fines de 1966, una docena de empresas interesada en registrar patentes relacionadas con estos productos: José Andreu Miralles y Juan Andreu Miralles [*Laboratorios Dr. Andreu*] (1940), Clemente Sierra (1941), *Instituto Farmacológico Latino* S.L. (1942), Jacinto Megías Fernández [*Instituto Llorente*] (1942), Ramón de Montaner Giraudier (1943-1950), Coloma Giralt Domènech (1947), Rogelio Boix Güell (1948), Juan Martí Camp y José Alberti Gubern (1951), *Sociedad Española de Especialidades Fármaco-Terapéuticas* S.A. (1955-1959), *Laboratorio Martín Cuatrecasas* S.A. (1956), Jesús Camón Cano [*Laboratorio Argenol*] (1960) y Marcelo Tabah Papo (1965).

3º. Se aprecia el interés ascendente despertado, desde los años de la guerra hasta 1942, por el registro de patentes relativas a sulfamidas y la preponderancia, hasta 1943, de las empresas germanas en este ámbito, al menos en lo que a la Administración española se refiere.

4ª. El interés por el registro de procedimientos relacionados con las sulfamidas comienza a decrecer a partir de la segunda mitad de 1940 para volver a tomar un cierto auge en los finales de la década de 1950, ahora fundamentado en procedimientos registrados por empresas suizas (*F. Hoffmann-La Roche & Cie.*, *Ciba* S.A., *Sandoz* A.G.), interesadas en la acción diurética de las sulfamidas y por una empresa belga, *Société Carbochimique* S.A., atraída por el empleo de estos productos, como colorantes, en la industria textil.

5ª. La primera patente de penicilina registrada en España lo fue por una empresa nacional, con fecha de 1 de enero de 1944, *Destilerías Aromáticas* S.L. presentó un expediente para proteger un “Procedimiento de obtención de la penicilina y de otras drogas medicinales partiendo de unos microorganismos llamados hongos”. Las patentes de empresas extranjeras relacionadas con la producción de penicilina comienzan a llegar a nuestro país en los meses finales de 1945; las introducen un par de empresas británicas: *Herts Pharmaceuticals Limited* / *Roche Products Limited* y la norteamericana *American Cynamid Company*; las primeras ofrecen un modelo de vendaje bacteriostático impregnado en penicilina; la segunda nos acerca a los sistemas de Monroe J. Romansky y George E. Rittman para aumentar la estabilidad de las penicilinas, potenciando su administración por vía oral.

6ª. Los primeros registros de penicilinas realizados en España atañen a procedimientos relacionados con extractos penicilínicos y con la producción de penicilina en condiciones sumergidas; a partir de 1945 comenzarán a generalizarse los procesos relativos a la producción de sales alcalinas de las penicilinas; desde 1948 se introducirán los relacionados con penicilinas procaínicas; y, desde 1950, los referentes a penicilinas biosintéticas. La determinación, en enero de 1959, de la estructura del 6-amino-penicilánico (6-APA), como el compuesto químico que forma el núcleo

fundamental de la molécula de penicilina, motivó un cambio sustancial en el trabajo sobre estos productos; la adición de diferentes moléculas sobre este 6-amino-penicilánico determinará la práctica totalidad de los expedientes de registro, vinculados con penicilinas, presentados en España desde enero de 1960 hasta el final de nuestro período de estudio; esta línea de trabajo se completó, en esta misma década de 1960, con el de las anhidro-penicilinas, como productos intermedios en la obtención de nuevos compuestos.

7ª. Los primeros desarrollos hispanos relacionados con penicilinas giran en la órbita de las preparaciones extemporáneas; tratan de ralentizar la cristalización de la penicilina sódica comercial, disminuir su proceso de absorción/eliminación o prepararla para su dispensación oral; de los inicios de 1949 datan las primeras propuestas del médico barcelonés Enrique Bassas Grau (1917-1979), a las que siguen las desarrolladas por los *Laboratorios Vigoncal S.A.* (Madrid) y por la empresa madrileña EFEYN S.A.; en todos los casos se trata de procedimientos que se realizan sobre la penicilina comercial.

8ª. Las empresas españolas comenzaron a registrar procedimientos industriales relacionados con penicilinas, al menos parcialmente novedosos, en el otoño de 1952; será el *Instituto de Biología y Sueroterapia* (Madrid), *Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.* (Barcelona), *Antibióticos S.A.* (Madrid) e *Instituto de Farmacología Española (Fundación Marqués de Urquijo S.L.)* (Madrid), los primeras en presentar sus desarrollos y, también, las que mayor presencia tuvieron con sus registros, en el período objeto de nuestro estudio.

9ª. Las empresas norteamericanas y británicas -en ocasiones con intereses entrecruzados- son las que copan, entre las extranjeras, el registro español de patentes de penicilinas; no obstante, la firma que más expedientes presenta es la danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted*, hasta un total de 22, la práctica totalidad de los registrados bajo esta nacionalidad, sin contar entre ellos los presentados por otras filiales del grupo, como la italiana *Leo Industrie Chimique Farmaceutiche*, con sede oficial en Roma (Italia), lo que parece poner de manifiesto los particulares intereses de esta empresa por el mercado español de penicilinas.

10ª. La mayor parte de las patentes registradas en España sobre penicilinas, en el período de tiempo estudiado, corresponden a empresas extranjeras, un total de 125 expedientes de los 155 analizados. Los solicitantes extranjeros acostumbran a registrar originalmente su patente en el país de origen de la empresa; pero no siempre fue así: la danesa *Lovens Kemiske Fabrik Ved A. Kongsted* presenta registros previamente patentados en Gran Bretaña, al igual que la francesa *Société d'Etudes de Recherches et d'Applications Scientifiques et Medicinales* (ERASM), o la italiana *Lepetit S.p.A.*, lo que parece mostrar el papel hegemónico que, al menos entre las empresas europeas interesadas en las patentes de penicilinas, parece jugar la Administración británica. Y la 'británica' *Beecham Research Laboratories Limited* utiliza la información de los expedientes previamente registrados ante la Administración norteamericana, una prueba más de la interrelación entre estas empresas británicas y sus 'filiales' norteamericanas.

Como norma general, el tiempo que transcurre entre la protección presentada en cualquier país extranjero y su formulación en el nuestro ronda los doce meses de cadencia.

11ª. La tramitación de las patentes relacionadas con penicilina presentadas por empresas españolas parece resolverse en poco más de 100 días; entre las patentes extranjeras, la valoración media del expediente tarda en torno a los 170 días. Parece

evidenciarse una cierta protección a los expedientes presentados por las empresas españolas, lo que concuerda bien con la situación autárquica vivía durante estos años.

12ª. El que el número de procedimientos de sulfamidas registradas en España sea menor, en el período de tiempo estudiado, que el de los relativos a penicilinas, parece poner de manifiesto que las penicilinas desplazaron a las sulfamidas, al menos en el interés de las empresas con voluntad de patentar sus procedimientos. Las patentes relacionadas con sulfamidas conocen su mayor florecimiento en el quinquenio 1941-1945; momento de inicio del registro de patentes de penicilinas que, desde entonces, alcanzan cifras significativamente superiores.

13ª. De las 97 patentes de penicilinas registradas entre 1954 y 1963, las páginas de *Ión*, la ‘revista del Sindicato Nacional de Industrias Químicas’, se hicieron eco de 51 de ellas; si bien las primeras recensadas fueron españolas (*Unión Químico-Farmacéutica S.A.E.* y *Antibióticos S.A.*), tras ellas siguieron las del resto de los países, sin que parezca definirse ninguna tendencia, ni entre las patentes seleccionadas, ni entre los países que registran sus patentes en España. El tiempo que tarda en anunciar la revista *Ión* una patente de penicilina registrada en nuestro país se aproxima al año, una media similar a la observada para las patentes de sulfamidas.

BIBLIOGRAFÍA

I. Referencias relacionadas con el desarrollo de sulfamidas y penicilinas

Sulfamidas

- COLEBROOK, Leonard, Méave KENNY. 1936. "Treatment of human puerperal infections, and of experimental infections in mice, with Prontosil". *The Lancet*, 227(5884): 1279-1281. Londres.
- DOHRN, Max, Paul DIEDRICH. 1938. "Albucid ein neues Sulfanilsäurederivat". *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 85: 2017-2018. Múnich.
- FILDES, Paul. 1940. "The mechanism of the anti-bacterial action of mercury". *The British Journal of Experimental Pathology*, 21(2): 67-73. Londres.
- FILDES, Paul. 1940. "A rational approach to research in chemotherapy". *The Lancet*, 235(6091): 955-957. Londres.
- GENERAL MEDICAL COUNCIL. 1938. "Winter session, nov. 22nd-26th, 1938". *The Lancet*, 232: 1321-1324. Londres.
- GUHA, Praphulla Chandra. 1922. "Constitution of the so-called dithio-urazole of Martin Freund. I". *Journal of the American Chemical Society*, 44(7): 1502-1510. Washington DC.
- HOUBEN, Josef (ed.). 1925. *Die Methoden Der Organischen Chemie. 3rd ed. 2. Special part*. Leipzig: verlag Georg Thieme.
- HOUBEN, Josef (ed.). 1941. *Die Methoden der Organischen Chemie. Vierter Band Spezieller Teil, Stickstoffhaltige Gruppen unter Mitarbeit von J. Angerstein [et al.]. 3 Aufl.* Leipzig: Georg Thieme.
- LONG, Perrin H., Eleanor BLISS. 1939. *Clinical and experimental use of sulfanilimide and sulfapyridine and allied compounds*. Nueva York: MacMillan.
- MARSHALL, Eli Kennerly, A.C. BRATTON, H.J. WHITE, J.T. LITCHFIELD. 1940. "Sulphaguanadine: a chemotherapeutic agent for intestinal infections". *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 57-163-188. Baltimore.
- NORTHEY, E. H. 1940. "Structure and Chemotherapeutic Activities of Sulfanilamide Derivatives". *Chemical Reviews*, 27: 85-197. Washington DC.
- PINNER, Adolf. 1892. *Die Imidoather and ihre Derivative*. Berlín: Oppenheim, 1892.
- RICHTER, Victor von, Richard ANSCHÜTZ. 1928-1935. *Chemie der Kohlenstoffverbindungen, oder Organische Chemie. 12. Aufl.* Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 3 vols.
- ROBLIN jr., Richard O., Philip S. WINNEK. 1940. "Chemotherapy I. Substituted Sulfanilamidopyridines". *Journal of the American Chemical Society* 62(8): 1999-2002. Washington DC.
- ROBLIN jr., Richard O., James H. WILLIAMS, Philip S. WINNEK, Jackson P. ENGLISH. 1940. "Chemotherapy. II. Some Sulfanilamido Heterocycles". *Journal of the American Chemical Society*, 62(8): 2002-2005. Washington DC.
- TREFOUEL, Thérèse, Jacques TREFOUEL, Federico NITTI, Daniel BOVET. 1935. "Activite du p-aminophenyl-sulfamide sur les infections streptococciques experimentales

de la souris et du lapin”. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*, 120: 756. Paris.

WINNEK, Philip S., George W. ANDERSON, Harry W. MARSON, H. Eldridge FAITH, Richard O. ROBLIN Jr. 1942. “Studies in Chemotherapy. V. Sulfanilylcyanamide and Related Compounds”. *Journal of the American Chemical Society*, 64: 1682-1685. Washington DC.

WOODS, Donald D. 1940. “The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide”. *British Journal of Experimental Pathology*, 21: 74-90. Londres.

WOODS, Donald D. 1962. “The biochemical mode of action of the sulphonamide drugs”. *Journal of General Microbiology*, 29: 687-702. Londres.

Penicilinas

ABRAHAM, Edgar, Ernst Boris CHAIN. 1940. “An enzyme from bacteria able to destroy penicillin”. *Nature*, 146: 837. Londres.

ABRAHAM, Edward, Ernst Boris CHAIN, C.M. FLETCHER, A.D. GARDNER, N.G. HEATLEY, M.A. JENNINGS, Howard Walter FLOREY. 1941. “Further observations on penicillin”. *The Lancet*, 238: 177-189. Londres.

ABRAHAM, Edward, Ernst Boris CHAIN, E.R. HOLIDAY. 1942. “Purification and some physical and chemical properties of penicillin: with a note on the spectrographic examination of penicillin preparations”. *The British Journal of Experimental Pathology*, 23(3): 103-119. Londres.

ABRAHAM, Edward, B.H. OLSON, G.G.F. NEWTON, D.M. SCHURMANS, J.R. SCHENCK, M.W. FISCHER, M.P. HARGIE, S.A. FUSARI. 1955. “Identity of cephalosporin N and synnematin B”. *Nature*, 176: 551. Londres.

ALBAHERY, Claude. 1953. *Maladies medicamenteuses*. Paris: Masson, 1953.

BATCHELOR, Frank Ralph, Frank Peter DOYLE, John-Herbert-Charles NAYLER, George Newbolt ROLINSON. 1959. “Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations”. *Nature*, 183: 257-258. Londres.

BECKER, Robert M., Jack BOGLE. 1956. “Effect of penicillinase on circulating penicillin”. *The New England Journal of Medicine*, 254: 952-953. Boston.

BERTHO, Alfred, Joseph MAIER. 1932. “Die katalytische Hydrierung von Aziden”. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 498: 50-61. Berlín

BETTI, Mario, Mario MAYER. 1908. “Optische Spaltung der α -Amino-phenyl-essigsäure”. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 41: 2071-2073. Berlín.

BLICKE, F.F., M.U. TSAO. 1944. “Antispasmodics. VII”. *Journal of the American Chemical Society*, 66(10): 1645-1648. Washington DC.

CARPENTER, Frederick H. 1948. “The anhydride of benzylpenicillin”. *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2964-2966. Washington DC.

CATCH, J.R., A.H. COOK, I.M. HETXBRON. 1942. “Purification and Chemistry of Penicillin”. *Nature*, 150(3813): 633-634. Londres.

- CAVEN, Robert Martin, George Druce LANDER. 1931. *Systematic inorganic chemistry from the standpoint of the periodic law: a text-book for advanced students*. Londres: Blackie & Son.
- CHAIN, Ernst Boris, Howard Walter FLOREY, Arthur D. GARDNER, Norman G. HEATLEY, Margaret A. JENNINGS, Jena ORR-EWING, A.G. SANDERS. 1940. "Penicillin as a chemotherapeutic agent". *The Lancet*, 236: 226-228. Londres.
- CHANDLER, Velma L., Monroe J. ROMANSKY, Henry WELCH, Jay A. ROBINSON, William W. ZELLER, Harry F. DOWLING, Harold L. HIRSH. 1948. "A method for determining the size and relative weight of penicillin particles and its importance in preparing adequate preparations of liquid penicillin in oil and wax". *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 37(1): 21-23. Washington DC.
- CLARIDGE, C.A., A. GOUREVITCH, J. LEIN. 1960. "Bacterial Penicillin Amidase". *Nature*, 187: 237-238. Londres.
- COMMITTEE ON MEDICAL RESEARCH, O.S.R.D. (Washington) / MEDICAL RESEARCH COUNCIL (Londres). 1945. "Chemistry of Penicillin". *Science*, 102: 627-629. Washington DC.
- COULTHARD, C.E., R. MICHAELIS, W.F. SHORT, G. SYKES, G.E.H. SKRIMSHIRE, A.F.B. STANDFAST, J.H. BIRKINSHAW, H. RAISTRICK. 1942. "Notatin: an Anti-bacterial Glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling". *Nature*, 150: 634-635. Londres.
- DAWSON, Martin Henry, Gladys I. HOBBY, Kart MEYER, Eleanor CHAFFEE. 1941. "Penicillin as a chemotherapeutic agent". En: Proceedings of the thirty-third annual meeting of the American Society for Clinical Investigation held in Atlantic City, N. J., May 5, 1941. *The Journal of Clinical Investigation*, 20(4): 434. Nueva York.
- DUNHAM, W.B., G. RAKE. 1945. "The relative activity of partially purified penicillin and of crystalline penicillin on *Treponema pallidum*". *American Journal of Syphilis, Gonorrhea and Venereal Diseases*, 28: 214-218. St. Louis.
- [Editorial/JAMA]. 1944 "Prolonging the action of penicillin". *Journal of the American Medical Association*, 126(7): 435. Chicago.
- [Editorial/NEJM]. 1946. "Combined Sulfonamide and Penicillin Therapy". *The New England Journal of Medicine*, 235: 562-563. Boston.
- FAWCETT, C.H., Daphne J. OSBORNE, R.L. WAIN, Ruth D. WALTER. 1953. "Studies on plant growth-regulating substances: VI. Side-chain structure in relation to growth-regulating activity in the aryloxyalkylcarboxylic acids". *Annals of Applied Biology*, 40(2): 231-243. Londres.
- FISCHER, Emil. 1905. "Synthese von Polypeptiden, XIII. Chloride der Aminosäuren und Polypeptide und ihre Verwendung zur Synthese". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 38(3): 2914-2925. Berlín.
- FLEMING, Alexander. 1929. "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*". *British Journal of Experimental Pathology*, 10: 226-236. Londres.
- FLOREY, Howard, Ernst-Boris CHAIN, N. G. HEATLEY, M. A. JENNINGS, A. G. SANDERS, Edward-Penley ABRAHAM, Mary Ethel FLOREY. 1949. *Antibiotics*. A

survey of penicillin, streptomycin and other antimicrobial substances from fungi, actinomycetes, bacteria and plants. Londres: Oxford University Press.

- FLOSDORF, Earl W. 1945. "Drying penicillin by sublimation in the United States and Canada". *The British Medical Journal*, 1: 216-218. Londres.
- FRANKEL, Max, Ephraim KATCHALSKI. 1943. "Derivatives of N-Carboxy- α -amino acid esters". *Journal of the American Chemical Society*, 65(9): 1670-1674. Washington, DC.
- GABRIEL-S. 1908. "Wandlungen der aminoketone". *Chemische Berichte*, 41: 1127-1156. Weinheim.
- GAMM, Kenneth E. 1945. "Penicillin therapy in pyelophlebitis". *Journal of the American Medical Association*, 128(16): 1159-1161. Chicago.
- GIRAL, Francisco. 1946. *Productos químicos y farmacéuticos. A base de la obra 'Preparación de productos químicos y químico-farmacéuticos' por el Prof. C. A. [Carl August] Rojahn.* México: Atlante, 3 vols.
- HAHN, L. 1947. "Stabilization of penicillin-salt solutions with sodium citrate". *Nature*, 160(4071): 639. Londres.
- HICKINBOTTOM, Wilfred John. 1938. *Reaction of organic compounds*, Nueva York: Longmans / Green & Co.
- HOBBY, Gladys L., Tulita F. LENERT, Beverly HYMAN. 1947. "The effect of impurities on the chemotherapeutic action of crystalline penicillin". *Journal of Bacteriology*, 54: 305-323. Washington DC.
- HOBSON, A.J., L.D. GALLOWAY. 1944. "Home-made penicillin". *The Lancet*, 243(6283): 164; 230-231. Londres.
- HUANG, H.T., A.R. ENGLISH, T. A. SETO, G. M. SHULL, B.A. SOBIN. 1960. "Enzymatic hydrolysis of the side chain of penicillins". *Journal of the American Chemical Society*, 82(14): 3790-391. Washington, DC.
- HUBER, W. Frederick. 1955. "Mono- α -aminoacyl and Mono- α -dipeptide triglycerides". *Journal of the American Chemical Society*, 77(1): 112-116. Washington DC.
- HURD, Charles D. Raymond I. MORI. 1955. "On acylhydrazones and 1,2,3-thiadiazoles". *Journal of the American Chemical Society*, 77(20): 5359-5364. Washington, DC.
- INGERSOLL, A. W. 1925. "A method for the complete, mutual resolution of inactive acids and bases". *Journal of the American Chemical Society*, 47(4): 1168-1173. Washington, DC.
- KAUFMANN W., K. BAUER. 1960. "Enzymatische Spaltung und Resynthese von Penicillin". *Naturwissenschaften*, 47: 474-475. Berlín.
- KNUDSENT, E.T., George Newbolt ROLINSON, R. SUTHERLAND. 1967. "Carbenicillin: a new semisynthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*". *British Medical Journal*, 3: 75-78. Londres.
- LEVENE, P.A., Alexandre ROTHEN, Martin KUNA. 1936. "Optical rotations of configurationally related azides". *Journal of Biological Chemistry*, 115: 401-413. Baltimore.
- LEVY, Gabor B. 1950. "A unit of penicillinase". *Nature*, 166: 740-741. Londres.

- MCINTOSH Jr. A. Vern, Elizabeth M. MEINZER, Robert H. LEVIN. 1948. "Steroid acids and their transformation products. III. Desulfurization of thiol esters of 3(β)-hydroxy-5-cholenic and -bisnor-5-cholenic acids". *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2955-2958. Washington DC.
- MEYER, Kart, G.L. HOBBY, E. CHAFFEE. 1943. "On esters of penicillin". *Science*, 97(2513): 205-206. Washington DC.
- MOYER, Andrew J., Robert D. COGHILL. 1946, "Penicillin: VIII. Production of penicillin in surface cultures". *Journal of Bacteriology*, 51(1): 57-78. Washington DC.
- MOYER, Andrew J., Robert D. COGHILL. 1947. "Penicillin X. The effect of phenylacetic acid on penicillin production". *Journal of Bacteriology*, 53(3): 329-341. Washington DC.
- PRATT, Robertson. 1947. "Influence of phosphate on stability of partially purified penicillins". *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 36(3): 69-72. Washington DC.
- PRATT, Robertson. 1947. "Stabilization of penicillin in aqueous solutions by low concentrations of phosphates". *Nature*, 159(4033): 233. Londres.
- PULVERTAFT, Robert J.V. 1943. "Bacteriology of war wounds". *The Lancet*, 242(6263): 1-2. Londres.
- PULVERTAFT, Robert J.V. 1943. "Local therapy of war wounds. 1. With Penicillin". *The Lancet*, 242(6264): 341-346. Londres.
- PULVERTAFT, Robert J.V., John YUDKIN. 1946. "Stabilisation of penicillin solutions with phosphate". *The Lancet*, 248(6417): 265-267. Londres.
- ROBERTS, E.C., C.K. CAIN, R.D. MUIR, F.J. REITHEL, W.L. GABY, J.T. VAN BRUGGEN, D.M. HOMAN, Philip A. KATZMAN, L.R. JONES, Edward A. DOISY. 1943. "Penicillin B, an antibacterial substance from *Penicillium notatum*". *The Journal of Biological Chemistry*, 147(1): 47-58. Baltimore.
- ROBINSON George H., Jas. E. WALLACE. 1943. "An inoculated penicillin dressing". *Science*, 98(2545): 329-330. Washington DC.
- RODD, E.H. 1956. (ed.). *Chemistry of Carbon-Compounds*. Amsterdam/Oxford: Elsevier Publishing Company.
- ROLINSON, George Newbolt, Frank Ralph BATCHELOR, D. BUTTERWORTH, J. CAMERON-WOOD, M. COLE, G. C. EUSTACE, Marian V. HART, M. RICHARDS, E.B. CHAIN. 1960. "Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis". *Nature*, 187: 236-237. Londres.
- ROMANSKY, Monroe J., George E RITTMAN. 1944. "A method of prolonging the action of penicillin". *Science*, 100(2592): 196-198. Washington DC.
- ROULSTON, W.J., L.F. HITCHCOCK. 1953. "Depletion of Gamma Isomer of Benzene Hexachloride in Cattle Dipping-Fluids". *Nature*, 172: 546-547. Londres.
- SABER, Robert O., R.H. HASEK. 1946. "Derivatives of the Methylchlorosilanes. IV. Amines". *Journal of the American Chemical Society*, 68: 241-244. Washington, DC.

- SALIVAR, Charles J., F. Howard HEDGER, Ellis V. BROWN. 1948. "Crystalline procaine penicillins". *Journal of the American Chemical Society*, 70(3): 1287-1288. Washington DC.
- SHEEHAN, John, James P. FERRIS. 1959. "The chemical conversion of penicillin G into a biologically active synthetic penicillin series". *Journal of the American Chemical Society*, 81(11): 2912. Washington DC.
- SHEEHAN, John C., George P. HESS. 1955. "New method of forming peptide bonds". *Journal of the American Chemical Society*, 77(4): 1067-1068. Washington DC.
- SHEEHAN, John C., Kenneth R. HENERY-LOGAN. 1959. "The total synthesis of Penicillin V". *Journal of the American Chemical Society*, 81(12): 3089-3094. Washington, DC.
- TRENNER Nelson R., Rudolf P. BUHS. 1948. "A crystalline form of benzylpenicillinic acid". *Journal of the American Chemical Society*, 70(9): 2897-2900. Washington DC.

II. Bibliografía secundaria

- BICKEL, Marcel H. 1996. "Eli K. Marshall, jr. (1889-1966): from biochemistry and physiology to pharmacology and pharmacokinetics". *Drug Metabolism Reviews*, 28(3): 311-344. Nueva York.
- BUD, Robert. 2007. *Penicillin: triumph and tragedy*. Nueva York: Oxford University Press.
- CALBET Josep M. y Jacint CORBELLÀ. 1981-1983. *Diccionari biogràfic de metges catalans*. Barcelona: Rafael Dalmau, 1981-1983. 3 vols.
- CALVET PUIG, M^a. Dolors. 2005. *Incidència de l'urbanisme en la funció econòmica i social de la ciutat: el rol de les ciutats mitjanes en un entorn metropolità*. [Tesis doctoral, dirigida por Francesc Solé Parellada y Pere Alavedra Robot]. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya.
- CHAQUÉS BONAFONT, Laura. 1997. *Políticas públicas y democracia en España: la política farmacéutica del franquismo a la democracia*. [Tesis doctoral, dirigida por Pere Vilanova Trias]. Barcelona: Universidad de Barcelona, 1997.
- CORLEY, Tony A.B. 2011. *Beechams, 1848-2000: From Pills to Pharmaceuticals*. Carnegie: Carnegie Publishing.
- COWEN, David L., Alvin B. SEGELMAN. 1981. *Antibiotics in historical perspective*. [S.l.]: Merck Sharp & Dohme International.
- CUATRECASAS I GENIS, Josep, María CUATRECASAS I ARUMÍ, Joan SUBIRÀ I ROCAMORA. 2006. *L'apotecari de Camprodon. La nissaga dels Cuatrecasas*. Barcelona: Editorial Mediterrània.
- DAILEY, George. 2005. "Insulin secretagogues: Who, what, when, and how?". *Current Diabetes Reports*, 5(5): 329-332. Philadelphia.
- DOMÍNGUEZ VILAPLANA, Rafaela. 2009. *Las empresas químico-farmacéuticas alemanas en España (1879-1945): una visión desde el registro de patentes*. [Tesis doctoral, dirigida por Antonio González Bueno]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

- DOMÍNGUEZ VILAPLANA, Rafaela, Antonio GONZÁLEZ BUENO. 2009. "Las primeras patentes de sulfamidas alemanas en España (1933-1945)" En: Esteban Moreno Toral, Antonio Ramos Carrillo (eds.). *Actas del 38 Congreso Internacional de Historia de la Farmacia*: [1-21]. Sevilla: Universidad de Sevilla.
- DUNN, P.M. 2008. "Dr Leonard Colebrook, FRS (1883–1967) and the chemotherapeutic conquest of puerperal infection". *Archives of Disease on Childhood - Fetal Neonatal*, 93: 246-248. Londres.
- GROSSMAN, Charles M. 2008. "The first use of penicillin in the United States". *Annals of Internal Medicine*, 15(149): 135-136. Philadelphia.
- GROSSMAN, Charles M. 2009. "The first use of penicillin in the United States [Letter]". *Annals of Internal Medicine*, 20(150): 145-146. Philadelphia.
- HARE, Ronald. 1970. *The birth of penicillin and the disarming of microbes*. Londres: Allen & Unwin.
- HENQUIN, J.-C. 1992. "The fiftieth anniversary of hypoglycaemic sulphonamides. How did the mother compound work?". *Diabetologia*, 35(10): 907-912. Berlín.
- JACKSON, y Eric A. 2008. "The first use of penicillin in the United States [Letter]". *Annals of Internal Medicine*, 15(159): 146. Philadelphia.
- JORDI I GONZÁLEZ, Ramón. 2003. *Colectanea de 'speciers', mancebos boticarios, boticarios, farmacéuticos practicantes de farmacia y farmacéuticos en Cataluña (1207-1997)*. Barcelona: Fundación Uriach.
- KAEMPFERT, Waldemar. 1950. "News of Dr. Paul Gelmo, Discoverer of Sulfanilamide". *Journal of the History of Medicine and allied Sciences*, 5: 213-214. Oxford.
- KLAUS, Abby. 2006. "Penicillin: 'the miracle drug'". *Illinois History*, 59: 19-22. Chicago.
- LAI, Jessica Christine. 2009. "Penicillins: their chemical history and legal disputes in New Zealand". *Chemistry in New Zealand*, 73(3): 116-124. Christchurch.
- LAPORTE. Joan. 1980. "Antoni Esteve". *Butlletí de la Secció de Matemàtiques de la Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques*, 5: 15-17. Barcelona.
- LEO. 2010. *Leo-Pharma time life*. Leo: Corporated communications, 2010 [www.leo-pharma.us].
- LESCH. John E. 1993. "Chemistry and biomedicine in an industrial setting: The invention of sulfa drugs". En: S.H. Mauskopf (ed.). *Chemical sciences in the modern world*: 158-215. Philadelphia [PA]: University of Pennsylvania Press.
- LESCH. John E. 1997. "The discovery of M & B 693 (sulfapyridine)". En: Gregory J. Higby, Elaine C. Stroud (eds.). *The Inside Story of Medicines: A Symposium*: 101-119. Madison [Wisconsin]: American Institute of the History of Pharmacy.
- LESCH. John E., 2007. *The first miracle drug: how the sulfa drugs transformed medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- LITTER, Manuel. 1986. *Farmacología experimental y clínica*. [séptima edición]. Buenos Aires: El Ateneo.

- LOUBATIÈRES-MARIANI, Marie-Madeleine. 2007. "The discovery of hypoglycemic sulfonamides". *Journal de la Societe de Biologie*, 201(2): 121-125. París.
- MASTERS, David. 1946. *Miracle drug*. Londres: Eyre & Spottiswoode.
- MORANDO, R. 1966. "Perrin H. Long, M.D., F.R.C.P. 1899-1965". *Med-Times*, 94(1): 138a. Irving [Calif.].
- ORTIZ, Andrés G. 2008. "The first use of penicillin in the United States [Letter]". *Annals of Internal Medicine*, 15(150): 145. Philadelphia.
- PARASCANDOLA, John. 1996. "Sulfones and the miracle at Carville". *Revue d'Histoire de la Pharmacie*, 44(312 suppl): 409-412. París.
- PEREIRA, Ana Leonor y João RUI PITA. 2005. "Alexander Fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945)". *Revista da Faculdade de Letras. História*, III série, 6: 129-151. Coimbra.
- PUIG, Nuria. 2006. "Antonio Gallardo Carrera". En: Francesc Cabana (ed.). *Cien empresarios catalanes*: 506-514. Madrid: LID.
- RAMÍREZ JEREZ, José Manuel (comp.). 2005. *Académicos numerarios del Instituto de España (1938-2004)*. Madrid: Instituto de España.
- ROCA, Francesc. 2006. "Notícies de la Història de Catalunya. 1880-1945: La Revolució industrial Transatlàntica (3)". *20 Minutos. Barcelona* [13-II-2006]: 6. Barcelona.
- ROLDÁN GUERRERO, Rafael. 1958-1963. *Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles*. Madrid: IMPHOE, 4 vols.
- ROLINSON, George Newbolt. 1998. "Forty years of β -lactam research". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 589-603. Londres.
- RODRÍGUEZ NOZAL, Raúl. 2011. "¿Fortuna o desdicha? La entrada de la penicilina en la España de la autarquía, un nuevo desafío para la farmacia y la industria farmacéutica". En: Antonio González Bueno, Guillermina López Andújar, María Dolores Cabezas López, Carmen Martín Martín, Juan Esteva de Sagrera (ed.). *Homenaje al Prof. Dr. José Luis Valverde*: 515-550. Granada: SDUHFE / Universidad de Granada.
- ROMERO DE PABLOS, Ana. 2009. "Penicillin patents in Spain". En: Ana Romero, Christoph Gradmann y María Jesús Santemases (eds.). *Circulation of Antibiotics: Journeys of Drug Standards, 1930-1970*: 229-249. [Madrid]: European Science Foundation.
- SEGARRA DOMÉNECH, José. 1997. "De antibiosis a antibioticoterapia: una realidad farmacoecológica". *Llull*, 20(38): 311-332, Zaragoza.
- SITTIG, Marshall. 1988. *Pharmaceutical manufacturing encyclopedia. Second edition*. Westwood [New Jersey]: Noyes Publications. 3 vols.
- SWAN, H.T. 1986. "C. G. Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy". *Medical History*, 30: 42-46. Londres.
- TURK, J.L. 1994. "Leonard Colebrook: the chemotherapy and control of streptococcal infections". *Journal of the Royal Society of Medicine*, 87(12): 727-728. Londres.
- WAGGONER, Jesse J. 2008. "The first use of penicillin in the United States [Letter]". *Annals of Internal Medicine*, 15(150): 145-146. Philadelphia.

- WAINWRIGHT, Milton. 1987. "The history of the therapeutic use of crude penicillin". *Medical History*, 31: 41-56. Londres.
- WAINWRIGHTA, Mark, Jette E. KRISTIANSEN. 2011. "On the 75th anniversary of Prontosil". *Dyes and Pigments*, 88(3): 231-234. Londres.
- WAYNE, Tiffany K., Martha J. BAILEY. 2011. *American women of science since 1900*. Santa Barbara [Calif.]: ABC-CLIO.
- WILLIAMS, Trevor I. 1984. *Howard Florey: Penicillin and after*. Nueva York: Oxford University Press.
- WOZEL, Gottfried. 1989. "The story of sulfones in tropical medicine and dermatology". *Internacional Journal of Dermatology*, 28(1): 17-21. Burell [Florida].
- WYATT, H. V. 1990. "Robert Pulvertaft's use of crude penicillin in Cairo". *Medical History*, 34: 320-326. Londres, 1990.